Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

---

# NORMOTHERME NIERENPERFUSION MIT STROMAFREIER HÄMOGLOBINLÖSUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Gabriele Schwenk
aus
Stuttgart

1979

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

---

# NORMOTHERME NIERENPERFUSION MIT STROMAFREIER HÄMOGLOBINLÖSUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Gabriele Schwenk
aus
Stuttgart

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Heimann

Berichterstatter: Professor Dr. J. Durst
(Professor Dr. L. Koslowski)

Fotodruck H. Resch · Georgstraße 50 · 7402 Kirchentellinsfurt

Den Herren
Professor Dr. Jürgen Durst
Professor Dr. Günther Schubert
Dozent Dr.Dr. Karl-Heinz Schmidt
Dr. F.G. Koch
Dr. H. Rahmer

danke ich herzlich für die mir bei der experimentellen Durchführung der vorliegenden Arbeit jederzeit gegebene Unterstützung und Beratung.

# INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seiten |
|---|---|---|
| I) | EINLEITUNG | 1-2 |
| II) | ALLGEMEINER TEIL | 2-11 |
| III) | MATERIAL UND METHODIK | |
| | A) Versuchstiere | 12 |
| | B) Perfusionssystem | 12-14 |
| | C) Perfusionsmedium | 14-18 |
| | D) Versuchsablauf | 18-21 |
| IV) | ERGEBNISSE | 22-45 |
| V) | DISKUSSION | 46-51 |
| VI) | ZUSAMMENFASSUNG | 52-53 |
| VII) | LITERATURVERZEICHNIS | 54-63 |
| VIII) | ANHANG | 64 |

## I) EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer stromafreien Hämoglobinlösung auf die Funktion warmperfundierter Nieren geprüft. Die bisher in der Literatur beschriebenen Experimente mit stromafreier Hämoglobinlösung waren meist an lebenden Tieren durchgeführt worden. Nierentransplantationen werden heute routinemäßig an großen Chirurgischen Zentren durchgeführt. Dabei ist es von wesentlicher Bedeutung, die Organvitalität zum Zeitpunkt der Transplantation zu kennen. Sie setzt vor allem eine geeignete Perfusion voraus. Es gibt zwei Möglichkeiten der Konservierung: Die Warm- und die Kalt-Konservierung. Die Warmkonservierung versucht so exakt wie möglich die normalen physiologischen Verhältnisse zu simulieren. Sie erfordert eine pulsatile Dauerperfusion bei physiologischem Druck, einem dem Blut möglichst ähnliche Perfusionslösung und Isothermie.
Die Kaltkonservierung wird heute ausschließlich bei der klinischen Nierentransplantation angewandt. Eine Dauerperfusion ist meist nicht erforderlich.

Bei der Nierenkonservierung kommt es darauf an, die Zeitdauer der warmen Ischämie so kurz wie möglich zu halten. Die längste warme Ischämiezeit darf eine Stunde betragen. Danach nimmt die Niere ihre Funktion nicht wieder auf. Sofort nach Entnahme muß die Niere möglichst schnell mit einer entsprechenden Elektrolytlösung auf eine Temperatur von $0^{\circ}$ bis $4^{\circ}$ C abgekühlt werden. Die Kaltlösungen sind in ihren Elektrolytkonzentrationen dem intrazellulären Milieu angepasst. Die entscheidende Wirkung dieser einmaligen Schwerkraftperfusion ist die starke Reduzierung des Zellstoffwechsels.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer stromafreien Hämoglobinlösung sowie die anfängliche Kalt- und die nachfolgende Warmperfusion auf die Nierenfunktion untersucht.

## II) ALLGEMEINER TEIL

Die Nierenkonservierung zum Zwecke der Transplantation fand in den letzten Jahren ein erhebliches wissenschaftliches Interesse. Viele der heute noch gebräuchlichen Methoden bauen auf Erkenntnissen auf, die bereits vor Jahrzehnten gewonnen wurden. Eine der ersten Mitteilungen über eine Organperfusion stammt von O. Langendorff aus dem Jahr 1895. 1987 machte Langendorff seine Untersuchungen über den Einfluß von Wärme und Kälte an Säugetierherzen. Er ließ dabei das Perfusionsmedium aus einem Vorratsbehälter über einen einfachen Magenschlauch durch das Organ strömen. Die Perfusion erfolgte nicht pulsatil ohne anschließend zu rezirkulieren, sondern durch die Schwerkraft. Er war der Begründer der heute noch am häufigsten verwendeten Schwerkraftperfusion. Später wurde dann von Bainbridge und Evans (1914) sowie von Verney und Starling (1922) eine Herz-Lungen-Präparation benutzt. Richards und Plant (1922) beobachteten das unterschiedliche Verhalten der Urinausscheidung und Urinzusammensetzung in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck. In den 30-iger Jahren kam im Rahmen der Gewebe- und Organkultur erneutes Interesse für die verschiedenen Techniken der Organperfusion auf. Carrel und Lindbergh (1938) erkannten, daß die bisher gebräuchlichen Verfahren zur Kultivierung von Organen,wegen der sich schnell entwickelnden bakteriellen Kontamination, schlechte Resultate ergaben.

Sie entwickelten deshalb im Jahre 1930 einen pulsatil arbeitenden Apparat, der sterile Pulsationen ermöglichte. Bickford und Winton (1937) untersuchten die Physiologie isolierter Nieren anhand von Insulin-und Kreatininausscheidung sowie den Einfluß der Temperatur. 1951 wurde von Lefèbre die Kaltkonservierung der Niere bei 4°C publiziert. Damals ließ sich eine Konservierungszeit von 24 Stunden erzielen. 1959 erzielten Kovacs, Persky, Stueber und Liletsky gute Resultate durch einfache hypotherme Perfusion während der ischämischen Periode. Als Perfusionsmedium verwandten sie eine eisgekühlte Salzlösung. Im Jahre 1961 verwandten Kiser, Telander, Peterson, Coe und Hitchcock zum ersten Mal Rheomakrodex zur Nierenkonservierung. Shatkin, Anthone, Anthone und MacNeill (1962) perfundierten in einem neuen Perfusionssystem Nieren erfolgreich mit heparinisiertem autologem Blut und bei einem renalen Druck von 100 mm Hg. Telander (1964) perfundierte isolierte Baboonieren für 24 Stunden bei 37° C. Die Perfusionslösung enthielt ein niedermolekulares Dextran mit einem niedrigen Hämatokrit. 1965 wiesen Ackermann und Barnard auf den Vorteil der Dauerkaltperfusion im Vergleich zur bloßen hypothermen Lagerung hin. Diese Annahme wurde durch die Bestimmung der energiereichen Phosphate bei der Kaltkonservierung unterstützt (Hierholzer, Zühlke, Hölscher und Dietz (1973)). Wurde die abgekühlte Niere eine Stunde auf Eis gelagert, so fiel die ATP-Konzentration auf Null ab. Wurde die gleiche Niere über 24 Stunden kalt perfundiert, so erfolgte wieder ein allmählicher Aufbau von ATP. Diese Untersuchung zeigt deutlich den Vorteil der Dauerperfusion. Ackermann und Barnard (1965) hatten die Beziehung zwischen Perfusionsdurchfluß und Druck untersucht. Bei schnellem Perfusionsdurchfluß stieg der Druck entsprechend stark an. Van Zyle, Van Zyle, Groenewald, Schooness, Lochner und Murphy (1968) untersuchten die Nierenphysiologie bei blutloser

Perfusion und anschließender Lagerung mit 100% Helium. Hendry, Struthers, Duguid und Hopkins (1968) kamen zu der Auffassung, daß die Dauerperfusion eventuell schwere Gefäßschäden hervorrufen kann. Das Perfusionsmedium bestand aus 50% frischem homologem Blut. Bei den perfundierten Nieren fand sich eine Gewichtszunahme von 25% bis 50% gegenüber ihrem Normalgewicht. Einen wesentlichen Fortschritt erzielten Belzer, Ashby und Dunphy (1967), Belzer, Ashby, Gulyassy und Powell (1968), Belzer, Ashby, Huang und Dunphy (1968), Belzer, Ashby, Mary und Dunphy (1968) mit denaturiertem Plasma. Sie zogen das kryopräzipitierte Plasma aus rheologischen Gründen verdünntem Blut vor. Dadurch ließ sich die Zusammenballung der Erythrozyten und die Freisetzung von Serotonin vermeiden (Swank, Fellman und Hissen (1963)). Die Kryopräzipitation (Einfrieren des Plasmas, schnelles Auftauen und Filtration) verhütete durch Entfernung von ca. 30% der Phospholipide Fettembolien der Niere (Belzer, Ashby, Huang und Dunphy (1968)). Gleichzeitig wurde eine Maschine entwickelt, welche den Transport von konservierten Nieren ermöglichte. Belzer et al. perfundierten die Niere kontinuierlich mit gekühltem Plasma, das in einem Membranoxygenator mit Sauerstoff durchsetzt und mit pulsierendem Strom durch die Niere gepumpt wurde. Nach dieser Methode wurden Hundenieren bis zu 72 Stunden mit guter Nierenfunktion nach der Transplantation aufbewahrt. Ingenieur Olov Hagström (Aktiebolaget Gambro, Lund) hatte 1970 zusammen mit Claes und seiner Gruppe (Claes, Aarell und Brunius (1970), Claes, Blohme und Gelin (1971), Claes, Blohme, Gelin, Gustavsson, Henriksson und Storm (1971)) einen Apparat zur Nierenperfusion nach diesem Prinzip konstruiert. Bei Hunden wurden nach 24- und 48-stündiger Perfusion gute Resultate erzielt. Diese Gambro-Perfusionsmaschine wurde bei den nachfolgenden Experimenten in etwas abgewandelter Form angewandt.

Ein weiterer Fortschritt in der Nierenperfusion war die Collins'sche Lösung (Collins, Bravo-Shugarmann und Terasaki (1969)). Collins et al. beobachteten, daß der intrazelluläre Elektrolytverlust während der Kaltperfusion durch die Verwendung von Lösungen, die dem intrazellulären Milieu entsprechen, vermieden werden kann. Derartige Kaltlösungen sind kaliumreich und natriumarm. Außerdem haben sie eine höhere Osmolarität. Sie bestehen aus einem Kaliumphosphatpuffer, und zur Erzielung der notwendigen Osmolarität wird Mannit, Dextran, Glukose und Eiweiß zugegeben. Diskutiert wird auch die Beigabe von Magnesiumionen als Membranstabilisator. Hartley, Collins und Clunie (1971) sowie Tanaka, Stevens und Terasaki (1971) erzielten gute Ergebnisse bei der Preservation menschlicher Nieren mit Collins' Lösung. Bei der kurzdauernden Schwerkraftperfusion kommt es zu einem allmählichen Ausgleich zwischen intra- und extrazellulärem Milieu. Bei der Dauerperfusion hingegen wird die extrazelluläre Flüssigkeit ständig erneuert. Von entscheidender Bedeutung hierbei ist die optimale Zusammensetzung der Perfusionslösung; dementsprechend sind die Lösungen zur Dauerwarmperfusion in ihrer Zusammensetzung komplizierter. Die entscheidende Wirkung der Kaltperfusion liegt in der starken Reduzierung des Zellstoffwechsels (Kiser, Telander, Peterson, Coe und Hitchcock (1961), Fuhrmann und Fuhrmann (1964)). Untersuchungen des arteriovenösen Sauerstoffwechsels bei Kaltperfusion zeigen einen Abfall des $O_2$-Verbrauchs auf 5% der Normalwerte (Levy (1959)).

Unter experimentellen Bedingungen geht zur Zeit die Bestrebung dahin, möglichst lange Konservierungszeiten zu erzielen. Diese wiederum sind von einer Verbesserung der Perfusionstechnik und des Perfusionsmediums abhängig. Wie schon in der Einleitung ausgeführt, unterliegen die Warm- und die Kaltperfusion ganz unterschiedlichen physiologischen Bedingungen. Es ist von entscheidender Bedeutung für die Vitalität der Niere, die Warmischämiezeit auf ein Minimum zu beschränken (Vogt und Farber (1968)). Die längste warme Ischämiezeit bei der Niere darf eine Stunde nicht überschreiten. Jenseits dieser Zeitdauer nimmt die Niere ihre Funktion nicht wieder auf (Johnson (1972)).

Unter physiologischen Bedingungen besitzt die Nierenzelle hohe Kalium-, Magnesium- und Phosphatkonzentrationen, jedoch niedrige Natrium- und Chlorkonzentrationen (Newburg und Leaf (1955), Edelmann und Liebmann (1957)). Der Sauerstoffmangel ist die häufigste Ursache der Zellschädigung. Durch den Eingriff in die Energieproduktion der Zelle (oxydative Phosphorylierung) wird der aktive Transport in den zellulären Membranen beeinträchtigt. Es kommt zu einem Zusammenbruch des aktiven Natriumtransports. Die Folge ist eine Neuverteilung der Ionen im intra- und extrazellulären Raum. vor allem aber eine Retention von Natriumionen und eine Ausschwemmung von Kaliumionen und - in geringem Maße - auch von Magnesium. Da jedoch mehr Natriumionen retiniert als Kaliumionen ausgeschwemmt werden, steigt der intrazelluläre osmotische Druck, und das Wasser strömt passiv in die Zelle ein. Dies hat ein Zellödem zur Folge, das bei längerem Bestehen in eine hydropische Degeneration übergeht. Eine Änderung der Membranpermabilität kann beim Sauerstoffmangel durch eine direkte Membranschädigung und die Mobilisierung von Calicium bedingt sein (Gedik und Totović (1974 )).

Keller, Swinney, Taylor und Uldall (1966) haben gezeigt, daß eine dem Zellinnern angepaßte Elektrolytlösung diese Elektrolytverschiebungen verhindert. Flores, Dibona, Beck und Leaf (1972) haben weiterhin festgestellt, daß die Osmolarität der extrazellulären Flüssigkeit wichtig ist, um das hydropische Anschwellen der Nierenzellen zu verhindern. Die hier angewandte Sack'sche Lösung (Bonhart (1971)) basiert auf der Collinschen Lösung (Collins et al. (1969)). Sack stellte eine hyperosmolare intrazelluläre Elektrolytlösung mit Mannitol als isomolares Agens (430 mosm/l) her. Mit dieser Elektrolytlösung führte er nach initialer Perfusion und anschließender hypothermer Lagerung eine 72-stündige erfolgreiche Nierenkonservierung durch.

Bei der anschließenden 3-stündigen Warmperfusion sollte die Wirkung einer von Bonhart (1971) hergestellten Hämoglobinlösung auf die Nierenfunktion geprüft werden. Die therapeutische Nutzung von Hämoglobinlösungen ist sowohl beim Tier (Hamilton, Hiller und van Slyke (1947)) als auch beim Menschen (O'Shaughnessy, Mansell und Slome (1939), Amberson, Jennings und Rhode (1949), Brandt, Frank und Lichtman (1951), Miller und McDonald (1951)) versucht worden, mußte jedoch wegen auftretenden typischen Nierenschädigungen wieder verlassen werden. Erst 1967 gelang Rabiner, Helbert, Lopas und Friedmann der Nachweis, daß stromafreie Hämoglobinlösungen beim Hund keine Nierenfunktionsstörungen verursachen. Es gelang ihnen, eine stromafreie Hämoglobinlösung herzustellen. Sie entfernten die gerinnungsaktiven Lipide, die bei der Hämolyse neben dem Hämoglobin aus den Erythrozyten frei wurden, durch spezielle Filtrierverfahren. Die Sauerstoffträgerfunktion dieser stromafreien Hämoglobinlösung konnte anhand von isovolämischen Austauschtransfusionen nachgewiesen werden (Rabiner, O'Brien, Peskin und Friedmann (1970)).

1973 untersuchte Unseld den Einfluß einer stromafreien Hämoglobinlösung auf den Kreislauf, die Sauerstoffaufnahme und die Nierenfunktion bei Zwergschweinen. Es wurden normovolämische Tiere oder auch Tiere im hämorrhagischen Schock untersucht. Die Sauerstofftransport- und Sauerstoffabgabefunktion der Hämoglobinlösung konnte durch die Bestimmung einer arterio-venösen Differenz des $O_2$-Gehaltes des Plasmas nachgewiesen werden. Er stellte fest, daß stromafreie Hämoglobinlösungen als Plasmaexpander durchaus erfolgversprechend sein können, da keine wesentliche Beeinträchtigung der Nierenfunktion zu erwarten sei. Außerdem schien nach seinen Untersuchungen eine stromafreie Hb-Lösung durchaus geeignet, als Sauerstoffträger - bzw. als Blutersatzlösung - therapeutische Anwendung auch beim Menschen zu finden.

Während im klinischen Bereich die Entscheidung zugunsten der Schwerkraftperfusion neigt, wird unter experimentellen Bedingungen eher die Dauerperfusion bevorzugt. Bei der Dauerperfusion wird die extrazelluläre Flüssigkeit ständig erneuert. In diesem Sinne sprechen die Befunde von Abouna (1968), der zeigen konnte, daß durch eine Erneuerung der Perfusionslösung längere Konservierungszeiten erzielt werden können. Die maschinelle Perfusion hat vor der einfachen Lagerung den Vorzug, neben den längeren Konservierungszeiten eine zuverlässigere Vitalitätstestung in vitro zu ermöglichen. Eine zuverlässige Aussage über die Vitalität des Organs in vitro ist nur durch Kombination mehrerer Untersuchungen möglich.

Hypoxiebedingte Störungen der Nieren lassen sich durch quantitative Bestimmungen der infolge anaerober Glykolyse frei werdenden Metabolite gut verfolgen (Henderson, Craig, Gorlin und Sonenblick (1969)). Vogt und Farber (1968) beschäftigten sich eingehend mit dieser Frage und fanden, daß der Milchsäuregehalt des Nierengewebes nach 10 Minuten langer Ischämiezeit das 2-fache und nach 25 Minuten das 5-fache des Grundwertes betrug. Umgekehrt verhielt sich das ATP-Niveau. Belzer, Ashby, Gulyassy und Powell wiesen 1968, Kohn und Ross 1971 darauf hin, daß die Freisetzung der LDH die ischämische Nierenschädigung während der Perfusion charakterisieren kann. Von Beisang, Graham, Lillehei, Dietzmann und Carter (1969) wurde experimentell festgestellt, daß die Wirksamkeit der Nierenkonservierung auf Grund des Enzymgehaltes der Spülflüssigkeit und des Perfusats zu charakterisieren ist. 1971 zeigten Horpácsy,Németh, Tárnoky, Barankay und Petri, daß die LDH schon vor dem Erscheinen und der Anreicherung der lysosomalen Enzyme auf die hypoxische Schädigung der Niere reagiert. 1970 empfahlen Herrmann, Turcotte, Sloan und O'Dell nach Reimplantationsexperimenten die LDH-Konzentration als Parameter für die Nierenfunktion. Grundmann und Pichlmaier (1973 b) stellten fest, daß weniger die Absolutmenge an LDH als vielmehr der Verlauf der Enzymausschüttung als Vitalitätskriterium zu verwenden ist. Bei höheren Temperaturen wurde eine vermehrte LDH-Ausschüttung trotz gleichbleibendem Perfusionsdruck gefunden. Weiterhin wurde die LDH-Konzentration des Perfusats von der Osmolarität der Perfusionslösung, der Temperatur, dem pH, der Prednisolon-Konzentration und dem Perfusionsdruck beeinflußt. Außerdem soll die LDH-Konzentration auf das Perfusatvolumen und das Nierengewicht bezogen werden. Ein plötzlicher Anstieg der LDH-Konzentration weist auf die irreversible Schädigung der Nierenzellen hin. 1974 untersuchten

Grundmann, Raab, Mensel und Pichelmaier menschliche Leichennieren bei hypothermen, maschinell nicht pulsierenden Perfusionsbedingungen. Eine zuverlässige Aussage über die Vitalität der Organe in vitro konnten sie nur durch Kombination mehrerer Untersuchungen, wie Perfusionsdruck, Durchströmungsrate, Enzymausschüttung und pH des Perfusats machen. Eine Bestimmung des Glukose- und Kaliumspiegels im Perfusat, aber auch die Bestimmung der Lactat/Pyruvat-Quotienten ließen keine prognostischen Aussagen zu. 1968 entwickelten Kessler und Mitarbeiter eine Methode, mit der unter Zuhilfenahme einer Platinmehrdrahtelektrode lokale Sauerstoffdrucke von Geweben im Bereich von Organoberflächen gemessen werden können (Kessler,Höper, Schäfer und Starlinger (1974)). Experimentelle Untersuchungen zeigten, daß damit zuverlässige Aussagen über die Vitalität des Gewebes möglich sind ( Rahmer, Durst und Schubert (1977)).

1967 stellten Rabiner, Helbert, Lopas und Friedmann fest, daß die Elimination des infundierten Hämoglobins aus dem Plasma auf mehreren Wegen geschieht. Dabei wurden bei deren versuchen 15%, bei den Versuchen von Unseld (1973) 7% des Hämoglobins im Urin ausgeschieden, das übrige Hämoglobin im Gewebe abgelagert.

Nach Murray, Connell und Pert (1961) kann Hämoglobin infolge glomerulärer Filtration, durch Bindung an $\alpha$- und ß-Globuline, sowie an Albumin, aus dem Plasma verschwinden. Freies Hämoglobulin im Plasma bindet sich zuerst an Haptoglobin, und bildet einen Hb-Haptoglobinkomplex, der wegen seiner Größe nicht filtrierbar ist und durch das retikulo-endotheliale System absorbiert wird (Lathem (1959)). Auf diesem Mechanismus beruht die Nierenschwelle für Hb (Anderson, Mouritzen und Gabrielles (1966)).

Die Permeabilität des Glomerulums für Hb ist sehr viel größer als für Albumin, obwohl beide das gleiche Molekulargewicht haben. Das im Urin gefundene Hb ist nicht von dem im Plasma verschieden, es findet also keine Dissoziation der Hämoglobinketten vor oder bei der Filtration statt (Lathem (1959)). Bonhard (1971) konnte im Urin keine Monomere oder Dimere von infundiertem Hb finden (Unseld (1973)). Ostrow, Jahndl und Schmid (1962) stellten fest, daß kleine Dosen Hämoglobin, welche die Bindungskapazität des Hbs nicht überschreiten, fast vollständig zu Bilirubin umgewandelt werden. Das Hb wird im retikulo-endothelialen System von Leber, Milz und Niere in Bilirubin umgewandelt.

Die Hb-Lösung hatte bei den Versuchen von Unseld (1973) keinen wesentlichen Einfluß auf die $Na^+$ und $K^+$-Exkretion und verhielt sich gegenüber dieser Teilfunktion der Niere relativ indifferent. Die klassische Vorstellung, nach der Hb-Zylinder die Tubuli verstopfen und dadurch eine Anurie erzeugen, wird nach neueren Untersuchungen nicht mehr angenommen (Buchborn (1973)).

## III) MATERIAL UND METHODIK

### A) Versuchstiere

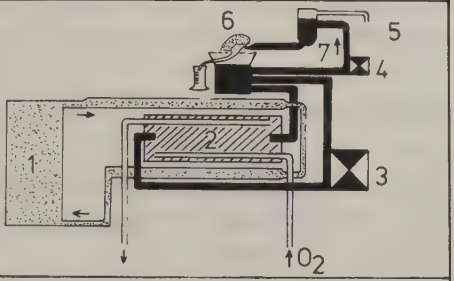
Für die Experimente wurden 13 Hausschweine mit 13 bis 25 kg Gewicht verwendet. Nach Prämedikation mit 4 bis 6 ml Azaperon (200 bis 300 mg Stresnil (Fa. JANSSEN GmbH., Düsseldorf)) i.m. und 1 ml Atropin in die Ohrvene wurden die Tiere mit Halothan, Lachgas und Sauerstoff narkotisiert und mittels Mittelbauchschnitt beidseitig nephrektomiert.

Vor der Nierenentnahme wurden als Thromboseprophylaxe 200 mg Procain und 5000 I.U. Liquemin in die Aorta injiziert. Spätestens 2 Minuten nach Entnahme der Nieren wurden zuerst die Vena renalis und dann die Arteria renalis abgeklemmt. Anschliessend wurden diese Nieren in eine Schale mit ca. 200 ml auf $4^{\circ}$ C abgekühlte Sacksche Lösung gelegt und unmittelbar durch Schwerkraftperfusion so lange gespült, bis aus der Vene eine klare Lösung abfloß. Danach wurden die Nieren unter sterilen Bedingungen gewogen und nach Kanülierung der Nierengefäße und des Ureters an das Perfusionssystem angeschlossen.

### B) Perfusionssystem

Als Perfusionssystem stand eine Gambro-Perfusionsmaschine, bestehend aus Organbehälter, einer nicht pulsatilen Rollerpumpe, Wärmeaustauscher, Travenol Membran-Oxygenator mit Füllvolumen sowie einem sterilen Perfusions-Kreislauf aus PVC-Schläuchen zur Verfügung (Abb. 1).

Abb. 1




1 THERMOSTAT, 2 MEMBRANOXYGEN.
3 OXYGENATORPUMPE, 4 PERFUSIONS-
PUMPE, 5 MANOMETER,
6 NIERE, 7 FILTER.

Die Rollerpumpe besteht aus einem halbrunden Gehäuse und enthält einen biegsamen Schlauch, welcher durch einen zweiarmigen Motor komprimiert wird. Ein Luftblasenauffanggefäß (Bubble-trap) sowie ein Manometer sind auf der arteriellen Seite dem Organ vorgeschaltet. Auf der arteriellen und venösen Seite werden Dreiweghähne dazwischengeschaltet, die sowohl eine direkte venöse als auch eine arterielle Abnahme ermöglichen. Der Urin wurde in ein dafür vorgesehenes Gefäß abgeleitet.

Der Tavenol Membran-Oxygenator 5 MO321 besteht aus einer Gummimembran aus Silikon und besitzt ein Füllvolumen von ca. 75 ml. Das Perfusat wird mit Hilfe der Rollerpumpe in den Oxygenator gepumpt, welcher mit 96% $O_2$ und 4% $CO_2$ oxygeniert wird. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß ein konstanter Perfusionsdruck von 110 mm Hg vorhanden war. Die Temperatur lag bei 37° C.

Nach Benutzung wurden die PVC-Schläuche mit Alhydrex (Fa. UPJOHN JOHNSON GmbH.) mehrmals gespült und der Organbehälter gassterilisiert.

C) Perfusionsmedium

Als Perfusionslösung wurden 700 - 1500 ml einer stromafreien Hämoglobinlösung (Fa. BIOTEST) zusammen mit im Handel erhältlichen 5% Human-Albuminlösungen im Verhältnis 1:2 verwendet.

Die Hämoglobinlösung der Fa. BIOTEST hat folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Gesamthämoglobin | 58 g/l |
| rel. % Met. Hb | 0,6 |
| Glukose | 30 g/l |
| Na | 88 mval/l |
| Kalium | 1,4 mval/l |
| Cl | 48 mval/l |
| Bicarbonat | 30 mval/l |
| pH-Wert bei 25$^{o}$ | 7,4 |

Das Präparat ist auf Sterilität und Pyrogenfreiheit geprüft.

Hämoglobinlösung hergestellt nach Bonhard (BIOTEST-Seruminstitut GmbH., Frankfurt/M.).

Das Humanhämoglobin wurde durch Hämolyse mit mineralisiertem, destilliertem $H_2O$ aus Erythrozyten herausgelöst, das Zellstroma durch Zentrifugieren und die K-Ionen durch Kationenaustauscher entfernt. Als letzter Schritt erfolgte die Sterilfiltration. Das Präparat wurde 1 Monat lang auf Keimfreiheit getestet.

Auf Dialyse zur Entfernung der Kaliumionen wurde verzichtet, wodurch 2,3 Diphosphoglycerat in der Lösung konserviert wurde. 2,3 Diphosphoglycerat ist zusammen mit H-Ionen und $CO_2$ ein wichtiges Regulans der $O_2$-Affinität des Hämoglobins (Benesch und Benesch (1969)).

Um eine Isotonie zu erhalten, wurden Elektrolyte und Glukose zugegeben.

Die $O_2$-Aufnahmekapazität der Hb-Lösung wurde durch die Modifikation der Methode von Van Slyke und Miller (1928) bestimmt. Anschließend wurde anhand der $O_2$-Sättigungskurve der p50-Wert der Hb-Lösung ermittelt. In der nachfolgenden Abb. No. 2 ist der physikalisch gelöste Sauerstoffwert in mg/l im Verhältnis zur Zeit aufgetragen.

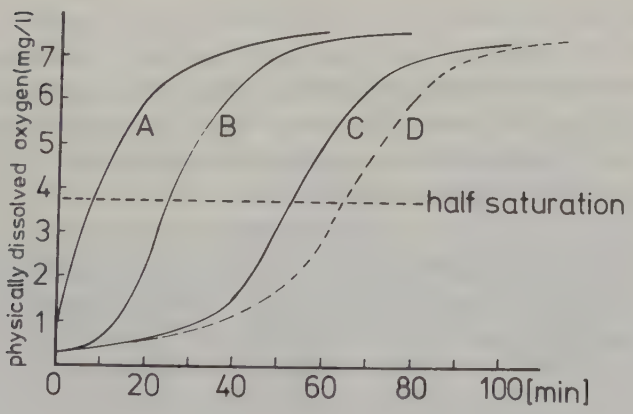



Abb. 2:
Kurve A stellt eine Lösung ohne Sauerstoffträger dar,
Kurve B stellt eine dialysierte Hb-Lösung dar,
Kurve C die von uns verwendete Hb-Lösung,
Kurve D Erythrozyten-Suspension mit vergleichbarem Hb-Gehalt.

Bei der Human-Albuminlösung handelt es sich um 5% Human-Albumin (1 ml enthält 50 mg Albumin)(aus der Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik, Tübingen).

Da die zur Verfügung stehenden Albumine in ihrem Elektrolytgehalt differieren, mußte das Ansatzschema jeder Lösung entsprechend dem jeweiligen Präparat verändert werden, wobei vor allem das Kalium durch KCl und der pH durch entsprechende Mengen Na Bicarbonat abgepuffert wurden.

Dabei wurden bei jedem Versuch zuerst der pH-Wert der Human-Albuminlösung, dann der pH-Wert der dazugegebenen Hb-Lösung gemessen. Nach Zugabe von Antibiotika sank der pH-Wert weiter ab, so daß die Lösung einen Tag vor Versuchsbeginn präpariert werden mußte, um bei Versuchsanfang über einen konstanten Wert zu verfügen. Entsprechend wurde der Kaliumgehalt korrigiert.

Um Keimfreiheit in der Perfusionslösung zu gewährleisten, wurden jeweils 1 Ampulle Streptomycin (1 g Streptothenat von CHEMIE GRÜNENTHAL GmbH.) und Megacillin (Megacillin forte von CHEMIE GRÜNENTHAL GmbH. ) zugegeben und bis zur Verwendung in einem sterilen Behälter bei $4^{o}$ C bis maximal 1 Tag aufbewahrt.

Die Ionen-Konzentrationen in den benützten Albumin-Hämoglobinlösungen sind in der nachfolgenden Abb. No. 3 wiedergegeben.

Abb. 3

| NIERE | Na | K | Cl | Ca | Osmo | Hb |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. | | mVal/l | | | osm/l | g% |
| 1 | 129 | 3 | 96 | 4,15 | 315 | 1,9 |
| 2 | 90 | 3,2 | 72 | 2,5 | 400 | 2,15 |
| 3 | 98 | 3,45 | 90 | 2,2 | 320 | 1,7 |
| 4 | 122 | 5,8 | 75 | 3,85 | 305 | 2,13 |
| 5 | 149 | 3,45 | 96 | 1,8 | 375 | 1,66 |
| 6 | 140 | 3,05 | 98 | 5,4 | 350 | 1,9 |
| 7 | 140 | 3,9 | 100 | 2,1 | 364 | 2,93 |
| 8 | 140 | 3,1 | 99 | 1,4 | 360 | 1,7 |

Elektrolytkonzentrationen, sowie Osmolarität u. Hb-Gehalt der verwendeten Perfusionslösungen für Nieren 1 - 8

Um die Zeit der Warmischämie zwischen Nierenentnahme und Warmperfusion möglichst klein zu halten und die Niere auf diese Art und Weise am wenigsten zu schädigen, wurde sie mit Hilfe von Schwerkraftperfusion schnell mit kalter Sackscher Lösung ausgespült. Dabei strömt das Perfusionsmedium aus einer Infusionsflasche durch Schwerkraft nicht pulsatil in das Organ, ohne anschließend wieder rezirkuliert zu werden. Außerdem ist sie mit Manitol hyperosmolar gemacht worden (37,5 g/l Manitol). Die Osmolarität ist 430 mosm/l, der pH-Wert beträgt 7,o bei $2^{o}$ C.

Weitere Bestandteile sind:

| | g/l | meq/l |
|---|---|---|
| $KH_1\ PO_4$ | 4,76 | $K^+$ = 126 |
| $K_1HPO_4 3H_2O$ | 9,70 | $Na^+$ = 14 |
| $KHCO_2$ | 2,30 | $PO_4^-$ = 120 |
| $NaHCO_3$ | 1,26 | Cl = 16 |
| $MgCl_2$ | (2 meq/ml) | $HCO_3^-$ = 20 |
| Manitol | 37,50 | $Mg^{++}$ = 16 |

Sack hat bei seinen Experimenten in Phasen der Ischämie einen Serumverlust und in geringem Ausmaß Magnesiumverlust aus dem Zellinnern sowie einen vermehrten Natrium-Chlor-Eintritt in die Zelle beobachtet. Durch Anbieten einer hyperosmolaren dem intrazellulären Milieu angepassten Elektrolytlösung wurden diese Elektrolytverschiebungen weitgehend verhindert.

D) Versuchsablauf

13 Hausschweine, 25-50 kg schwer, wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I bestand aus 8, Gruppe II aus 5 Tieren, die, wie oben beschrieben, nephrektomiert wurden. Nach maximal 2 Minuten Warmischämiezeit wurden die Nieren mit Sackscher Lösung durchspült und anschließend an das Perfusionssystem angeschlossen. Vor Versuchsbeginn wurden nach genügend langer Oxygenierung mit Carbogen Perfusionsproben zur Bestimmung von Natrium, Kalium, Chlor, Calcium, Osmolarität, Hb, pH, $PO_2$ und $PCO_2$ abgenommen. Nach Einlegen der Niere in das dafür vorgesehene Gefäß und Anschluß der arteriellen und venösen Pole wurde der Druck durch Regulation des Flows auf 110 mm Hg konstant eingestellt.

Die Gruppe I wurde maximal 3 Stunden perfundiert und dabei regelmäßig Perfusions- und Urinproben abgenommen. Abnahmezeiten in Minuten nach Perfusionsbeginn: 1,3, 30, 60, 120 und 180. Gleichzeitig wurde der Urinflow nach 3, 30, 60, 120 und 180 Minuten gemessen. Für die biochemischen Untersuchungen wurden die Werte nach 3, 30, 60, 120 und 180 Minuten aus dem venösen Schenkel entnommen. Ebenso wurden nach 3, 30, 60, 120 und 180 Minuten arterielle und venöse Perfusionsproben zur Bestimmung von pH, $PO_2$, $PCO_2$ sowie den restlichen Basenstatus entnommen.

Aus den in regelmäßigen Zeitabschnitten gewonnenen Perfusionsproben wurden Lactat, Pyruvat, LDH, ATP, Gesamteiweiß, Kreatinin, Harnstoff, anorganischer Phosphor, Harnsäure, Elektrolyte und Osmolarität ermittelt.

Aus den Urinproben wurden in entsprechender Weise ATP, Gesamteiwiß, Kreatinin, anorganischer Phosphor, Harnsäure, Elektrolyte, Osmolarität, LDH und Bilirubin ermittelt.

Für die entsprechenden Labordaten wurden folgende Bestimmungsmethoden angewandt:

Kreatinin:
Nach der Methode von Chasson et al. und Rapoport, die eine Automatisierung der bekannten Jaffa-Reaktion darstellt (Chasson, Grady und Stanley (1961), Hudson und Rapoport (1968)).

Harnsäure:
Die Chemie der Methode wurde von Sobrinho-Simoes und Pereira (1965) beschrieben; das Autoanalyzer-Verfahren wurde aus der Arbeit von Musser und Ortigoza (1966) abgeleitet.

Harnstoff - Stickstoff:
Die Methode basiert auf der von Marsh, Fingerhut und Miller (1965) beschriebenen Automatisierung der manuellen Methode nach Brown, Balbrook und Greenwood (1957).

Gesamteiweiß: (Biuret-Methode)
Diese Methode stellt eine Automatisierung der photometrischen Serum-Eiweiß-Bestimmung mit dem Biuret-Reagenz nach Weichselbaum (1946) dar.

Pyruvat wurde nach der Methode von Czok und Lamprecht (1970) bestimmt.

Anorganischer Phosphor:
Methode nach Zilversmit et al. (1950), Bogatzki (1938).

Lactat Dehydrogenase:
Nach der Methode von Wroblewski und Ladue (1955)

Lactat:
Nach der Methode von Hoherst (1970).

Hämoglobin:
Nach der photometrischen Kaliumferridcyanid-Methode von Van Kampen und Zijlstraa (1961).

ATP:
Adenosin-5-triphosphat-Methode nach Bücher (1947).

Osmolarität:
Bestimmung durch Gefrierpunktmessung mit einem elektronischen Halbmicro-Osmometer.

Elektrolyte wurden flammenphotometrisch im Autoanalyzer bestimmt.

Die pH und $PCO_2$-Werte wurden mit Hilfe des Mikroastropgerätes gemessen, die zugehörigen $O_2$-Drucke mit der $PO_2$-Elektrode von Radiometer.

## IV) ERGEBNISSE

### G r u p p e I:

8 Nieren von Hausschweinen wurden maximal 3 Stunden mit einer Albumin-Hämoglobin-Lösung unter normothermen Bedingungen bei konstantem Druck (110 mm Hg) perfundiert. Der gemessene Perfusionsflow in ml/min lag zu Beginn der Perfusion bei den Nieren 1, 2, 3, 4, 6 und 8, deren Nierengewicht zwischen 60 - 74 g betrug, sehr konstant bei 62 bzw. 63 ml/min. Im Laufe der Perfusion nahm er etwas ab und war im Verlauf von 60 Minuten auf ungefähr 60 ml/min gefallen. Auf diesem Wert hielt er sich bis zum Ende der Perfusion.

Bei Niere 7 wurde bei der Nephrektomie einer der zwei venösen Abgänge ligiert. Hier lag der Perfusionsflow von Anfang an bei 62,5 ml/min ( = 0,87 ml/g/min) und fiel nach 60 Minuten bis zum Ende der Perfusion auf 40 ml/min ab.

Bei Niere 5 handelte es sich um eine Schockniere. Nach 5-minütiger Perfusionszeit wurde die Perfusion für einige Minuten infolge eines technischen Fehlers unterbrochen, so daß es zu einem kurzfristigen Druckabfall kam. Dieser Druckabfall wurde sofort reguliert, so daß die 85 g schwere Niere bei einem Perfusionsflow von 68,2 m/min ( = 0,8 ml/g/min) bis zum Ende perfundiert wurde, wobei jedoch im Ganzen nur etwa 10 ml Urin produziert wurden (Tabelle I).

Tabelle No.1

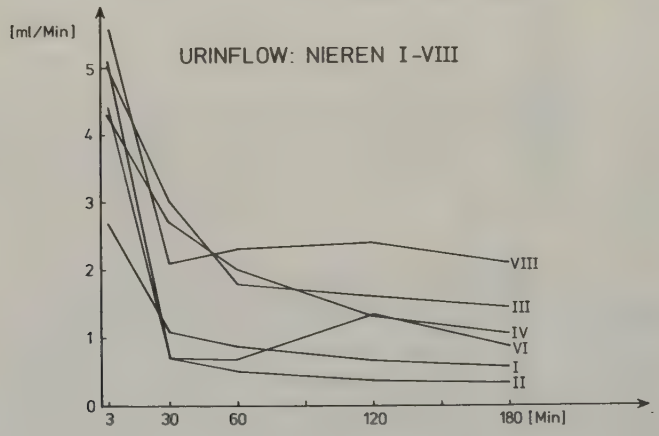
PERFUSIONSFLOWRATE BEI KONSTANTEM DRUCK VON 110 mm Hg

| Niere No. | Nierengewicht vor Perfusion g | Perfusionsflow 3 Min. | 30 Min. | 60 Min. ( ml/min) | 3 Min. | 30 Min. | 60 Min. (ml/min/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 62 | 63,16 | 63,16 | 60,o | 1,o2 | 1,o2 | o,96 |
| 2 | 61 | 63,16 | 63,16 | 60,o | 1,o3 | 1,o3 | o,98 |
| 3 | 60 | 62,5 | 62,5 | 61,2 | 1,o4 | 1,o4 | 1,o2 |
| 4 | 65 | 62,5 | 62,5 | 60,2 | o,96 | o,96 | o,94 |
| 5 | 85 | - | 68,2 | 68,2 | - | o,8o | o,8o |
| 6 | 69 | 62,5 | 62,5 | 61,2 | o,9o | o,9o | o,88 |
| 7 | 72 | 62,5 | 62,5 | 40,o | o,87 | o,87 | o,55 |
| 8 | 74 | 62,5 | 62,5 | 67,4 | o,84 | o,84 | o,91 |

Die Urinproduktion der Nieren 1,2,3,4,6,7 und 8 trat eine Minute nach Anschluß der Nieren an das Perfusionssystem spontan ein, wobei der Urin noch klar war. Die zweite Probe wurde 3 Minuten nach Perfusionsbeginn abgenommen, wobei der Urin rötlich gefärbt war. Im weiteren Verlauf der Perfusion wurde kontinuierlich Urin produziert.
Die Darstellung des Urinflows ergab folgende Kurven:

Abb. No.4:

Urinflowrate in ml/g/min bei konstantem p = 110 mm Hg




Niere 5 produzierte insgesamt nur 10 ml Urin. Bei Nieren 1,2,3,4,6 und 8 nimmt der anfängliche Urinflow nach den ersten 30 Minuten ab, um dann gegen Ende der Perfusion gleichzubleiben oder leicht anzusteigen. Niere 7 zeigt nach den ersten 3 Minuten eine steigende Tendenz, die dann in einen gleichbleibenden Urinfluß bis zum Ende übergeht.

Die Laborchemischen Bestimmungen im Perfusat

N a t r i u m

Die Natriumwerte liegen in den ersten 3 Minuten zwischen 95 und 210 mval/l, wobei Niere 5 mit 190 und Niere 8 mit 210 an der obersten Grenze liegen. Mit Ausnahme von Niere 6, wo der Natriumwert innerhalb der ersten 60 Minuten wieder abfällt, um danach wieder leicht anzusteigen, steigt die Natriumkonzentration im allgemeinen geringfügig an.

C h l o r i d

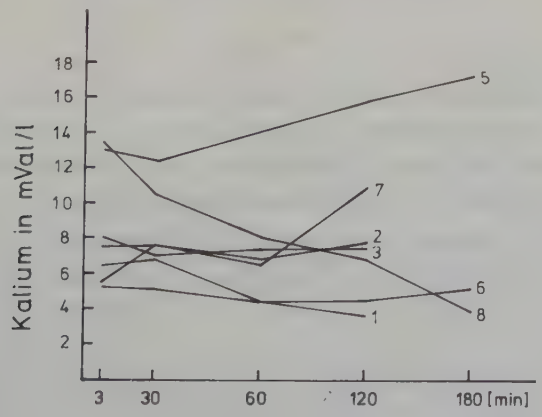
Die Chloridkonzentrationen liegen nach den ersten 3 Minuten bei 69 - 99 mval/l. Bei Niere 4, 5, 6 und 8 zeigt sich ein minimaler Anstieg in der ersten Stunde, der gegen Ende der Perfusion unbeträchtlich abnimmt.

K a l i u m

Die Kaliumkonzentrationen ergeben nach den ersten 3 Minuten Werte zwischen 5,4 - 13,5 mval/l, wobei Niere 5 und 8 mit 13 mval/l den Ausgangswert darstellen. Im weiteren Verlauf zeigt die Niere 5 stark ansteigende Kaliumwerte bis zu 17,5 mval/l, ebenso Niere 7, die nach 120 Minuten den Wert von 11 mval/l erreicht. Niere 8 weist stark abfallende Kaliumwerte auf. Bei Niere 1, 2, 3 und 6 ist eine leicht abnehmende Tendenz zu sehen.

Abb. 5

Kaliumkonzentration im Perfusat bei Nieren 1-8

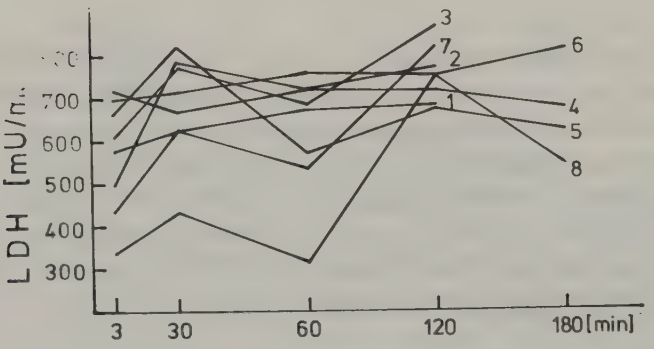


L D H

Die LDH-Aktivitäten liegen nach den ersten 3 Minuten zwischen 344 - 716 mU/ml. Innerhalb der nächsten 30 Minuten steigt die LDH an, um innerhalb der nächsten 30 Minuten abzunehmen und nach insgesamt 60 Minuten wieder stärker anzusteigen, so daß die Werte zwischen 668-865 mU/ml liegen.

Abb. 6

Lactatdehydrogenase im Perfusat bei Niere 1-8




C a l c i u m

Die Calciumwerte liegen am Anfang zwischen 1,4-5,3 mval/l, wobei die Endkonzentrationen bei Niere 2, 3, 5, 6 und 7 höher liegen als die Anfangskonzentrationen. Niere 1 und 8 weisen eine geringere Endkonzentration auf.

Anorganisches Phosphat

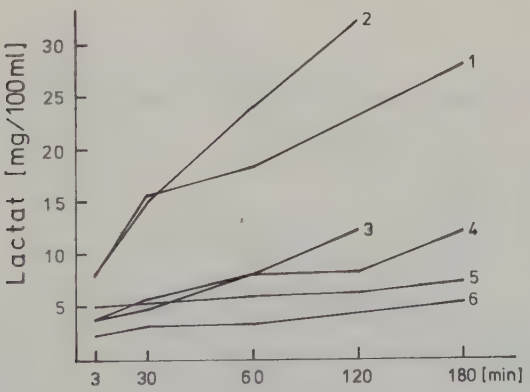
Die Konzentrationen liegen zwischen 5,o - 7,4 mg/100 ml. Mit Ausnahme von Niere Nr. 3 nehmen die Konzentrationen in den ersten 60 Minuten ab, um dann wieder leicht anzusteigen. Bei Niere 3 steigt die Konzentration von Anfang an leicht an.

Lactat

Die Werte der Lactatkonzentrationen liegen in den ersten 3 Minuten zwischen 2,4 - 8 mg/100 ml. Im weiteren Verlauf der Perfusion steigen die Lactatkonzentrationen bei allen Nieren beträchtlich an, so daß Werte zwischen 5,12 - 32,o mg/100 ml auftreten.

Abb. 7

Lactatkonzentrationen im Perfusat, Niere 1-8




Harnsäure

Die Harnsäurekonzentrationen liegen zwischen o,5 - 1,3 mg/100 ml. Die Werte nehmen initial ab, um nach 2 Stunden leicht anzusteigen.

Total Protein

Die Anfangskonzentrationen liegen zwischen 3,7 - 6 g/100ml, wobei eine leichte Steigung der Werte zu sehen ist.

ATP

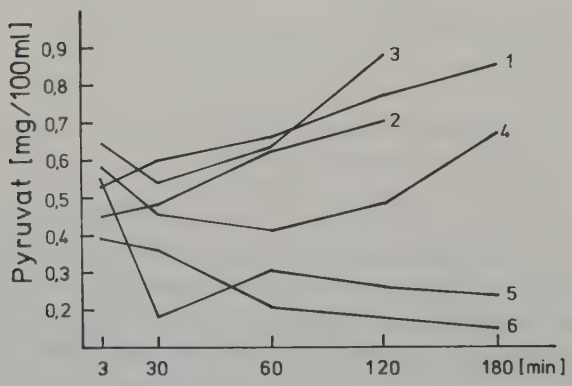
Die ATP-Konzentrationswerte bewegen sich zwischen 0,63 - 4,51 mg/100 ml.

Pyruvat

Die Pyruvatkonzentrationen liegen initial zwischen 0,39 - 0,65 mg/100 ml. Wie aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich, weisen Niere 3, 4, 5 und 6 in den ersten 30 Minuten eine Pyruvatabnahme auf, so daß die Werte zwischen 0,17 - 0,6 mg/100 ml liegen, jedoch gegen Ende der Perfusion wieder ansteigen. Bei Niere 1 und 2 setzt sich der initiale Pyruvatanstieg bis zum Ende der Perfusion fort.

Abb. 8

Perfusat-Pyruvatkonzentrationen bei Niere 1-6



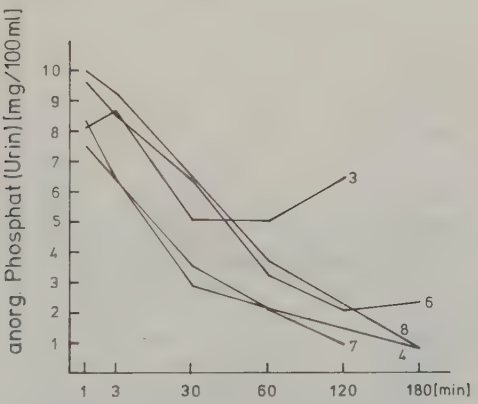
Die Konzentrationsbestimmungen im Urin

A n o r g a n i s c h e s  P h o s p h a t

Man erhält initiale Konzentrationen zwischen 8,1 - 10,o mg/100 ml. Die Konzentrationen nehmen im weiteren Verlauf stark ab und erreichen nach 2 Stunden Minimalwerte von 1,o - 2,2 mg/100 ml. Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, steigt die anorganische Phosphatkonzentration bei Niere Nr. 3 nach 30 Minuten wieder leicht an.

Abb. 9

Anorganische Phosphat-Konzentration im Urin, Niere 3,4, 6, 7 und 8




A T P

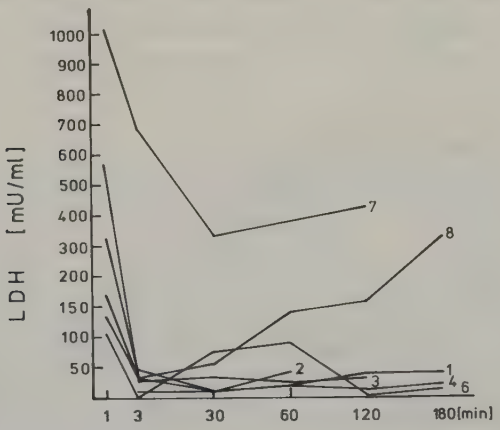
ATP wurde bei Niere 3, 4, 6 , 7 und 8 gemessen, wobei die Anfangskonzentrationen zwischen 1,8 - 4,15 mg/100 ml liegen. Bei Niere 6 und 8 ist nach 3 Minuten ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der dann in einen Abfall übergeht. Bei Niere 3, 4 und 7 ist nach 3 Minuten ein leichter Abfall zu verzeichnen, der bis zum Ende anhält.

L D H

Die LDH-Anfangsaktivitäten liegen nach einer Minute zwischen 105 - 1069 mU/ml. Nach weiteren 3 Minuten fallen die Werte auf 10 - 687 mU/ml ab. Bei allen Nieren ist nach den ersten 3 Minuten und im Verlauf der nächsten 30 Minuten ein deutlicher LDH-Abfall zu erkennen, der bei Niere 7 und 8 wieder zu einem leichten Anstieg führt. Die restlichen Nieren halten sich auf den abgefallenen Werten oder nehmen geringfügig weiter ab, so daß die Endkonzentrationen zwischen 19 - 38 mU/ml liegen.

Abb. 10

LDH-Konzentrationen im Urin, Niere 1,2,3,4,6,7 und 8




N a t r i u m

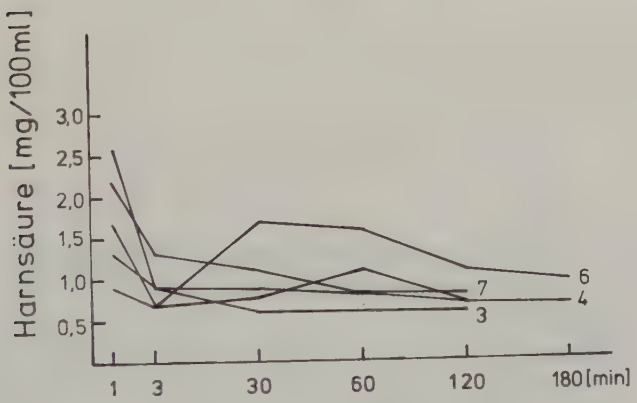
Die nach einer Minute gemessenen Werte liegen zwischen 52 - 160 mval/l. Nach 3 Minuten steigen die Werte für Niere 1,3,6,7 und 8 an, während die Natriumkonzentration für Niere 2 langsam abnimmt. Die Endkonzentrationen liegen zwischen 108 - 216 mval/l.

H a r n s ä u r e

Die Harnsäurekonzentrationen liegen initial zwischen 0,9 - 2,9 mg/100 ml. Die Harnsäurewerte fallen bei allen Nieren,mit Ausnahme von Niere Nr. 6, in den ersten 30 Minuten ab, um dann gleichzubleiben oder leicht anzusteigen, so daß die Endkonzentrationen zwischen 0,6 - 1,1 mg/100 ml liegen. Niere Nr. 6 steigt schon innerhalb der ersten 30 Minuten an, um nach 60 Minuten wieder stärker abzufallen.

Abb. 11

Harnsäurekonzentrationen im Urin bei Niere 3,4,6,7, 8.




C h l o r

Die nach einer Minute gemessenen Chlorwerte liegen zwischen 25 - 78 mval/l. Bei Niere 1, 3, 4, 6 und 7 nehmen die Konzentrationen bis zum Ende der Perfusion langsam zu. Bei Niere 8 fallen die Werte langsam ab.

Total Protein

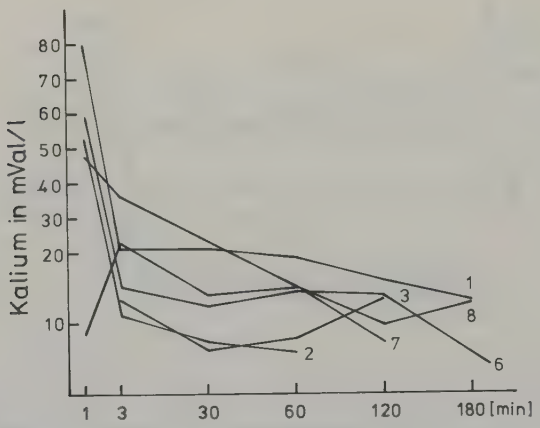
Total Protein wurde nur für Niere 3, 4, 7 und 8 gemessen, wobei die Anfangskonzentrationen zwischen 0,5 - 1,5 ng/100 ml liegen. Bis zum Ende der Perfusion nehmen die Konzentrationen langsam zu.

Kalium

Die nach einer Minute gemessenen Kaliumwerte liegen zwischen 8 - 80 mval/l. Bei Niere 1, 2, 3, 6 und 7 fallen die Konzentrationen nach 3 Minuten stark ab, um bis zum Ende etwas langsamer abzufallen. Niere 8 steigt nach 3 Minuten an, um danach leicht wieder abzufallen.

Abb. 12

Kaliumionen-Konzentrationen im Urin bei Niere 1, 2, 3, 6, 7 und 8




Calcium

Die Anfangskonzentrationen liegen zwischen 1,o - 4,5 mval/l. Sie verändern sich unbedeutend.

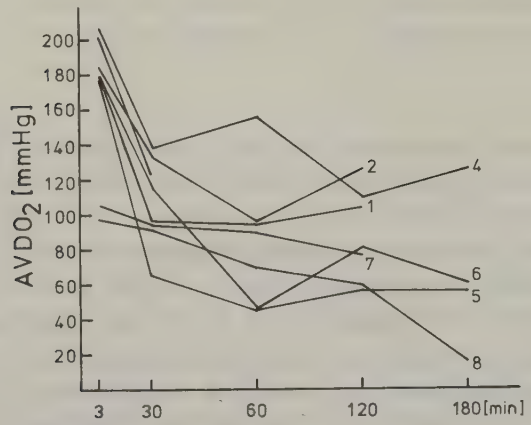
Die venösen und arteriellen Perfusatproben für die gasanalytischen Untersuchungen wurden analog den Perfusionsproben für die laborchemischen Untersuchungen entnommen.

$PO_2$

Die $PO_2$-Werte der Perfusionslösungen nach genügend langer Equilibrierung mit 96% $O_2$ und 4% $CO_2$ liegen zwischen 280 - 400 mmHg. Drei Minuten nach Perfusionsbeginn lagen die arteriellen Werte zwischen 248-375 mmHg. Die entsprechenden venösen Werte lagen zwischen 96 - 191 mmHg, so daß die arterio-venösen $PO_2$-Differenzen zwischen 105 - 227 mmHg lagen. Im weiteren Verlauf der Perfusion veränderten sich die arteriellen $PO_2$-Werte geringfügig, während die venösen Werte bei allen Nieren stark zunahmen, so daß sie am Ende der Perfusion Werte zwischen 183 - 387 mmHg erreichten.

Die nachfolgende Abbildung zur Darstellung der arteriovenösen $PO_2$-Differenzen ($AVDO_2$) zeigt initial einen starken Abstieg. Nach 30 Minuten fallen die Werte mit Ausnahme von Niere Nr. 4 weiter ab, um nach 60 Minuten wieder leicht anzusteigen.

Abb. 13
Arteriovenöse $PO_2$-Differenz bei Nieren 1 - 8




$PCO_2$

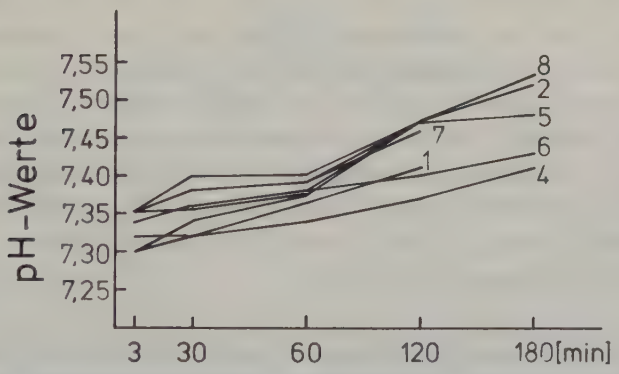
Die $PCO_2$-Werte der reinen Perfusionslösung liegen zwischen 31,5 - 37,5 mmHg. 3 Minuten nach Perfusionsbeginn liegen die arteriellen $PCO_2$-Werte zwischen 37 - 45 mmHg. Im weiteren Verlauf verändern sie sich nur geringfügig.
Die venösen $PCO_2$-Werte liegen initial zwischen 35 - 46 mmHg und gegen Ende der Perfusion zwischen 37 - 47 mmHg.

pH

Bei Gruppe I lagen die pH der reinen Perfusionslösungen zwischen 7,2 - 7,4. Nach 3-minütiger Perfusion lagen die arteriellen Werte zwischen 7,3 - 7,35, die venösen Werte zwischen 7,27 - 7,39. Im Verlauf der Perfusion nahmen die arteriellen pH-Werte langsam zu, so daß die Endkonzentrationen zwischen 7,41 - 7,53 lagen.
Die venösen pH-Werte nahmen ebenfalls zu; ihre Endwerte lagen zwischen 7,37 - 7,54.

Abb. 14

Arterielle pH-Werte für Nieren 1,4,5,6, 7 und 8

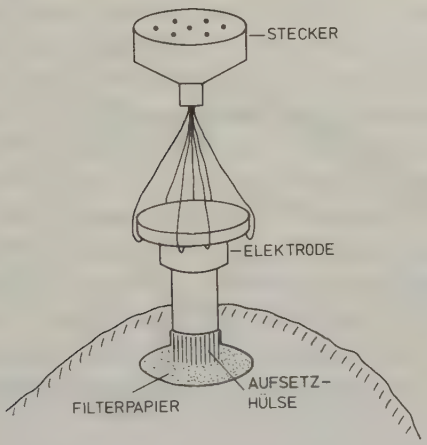


Aus der Versuchsgruppe II wurden entsprechend der Gruppe I vor Perfusionsbeginn pH, $PO_2$, $PCO_2$ sowie die Osmolarität, die Elektrolyte und das Hämoglobin gemessen. In dieser Versuchsreihe wurde beidseitig nephrektomiert.
Während die zu perfundierende Niere nach maximal 2 Minuten Warmischämie mit Sackscher Lösung durchspült und danach sofort an die Perfusionsmaschine angeschlossen wurde, wurde die kontralaterale Niere - mit Ausnahme von Niere Nr. 2 - nicht mit Sackscher Lösung durchgespült, sondern sofort nach Entnahme für die histologische Untersuchung in Horizontalscheiben geschnitten und in 5% gepufferter Formalinlösung fixiert. Der Perfusionsdruck wurde auf 110 mmHg, die Temperatur bei $37^{\circ}$ C konstant gehalten.

Die Perfusionszeit wurde auf 3 Stunden festgesetzt. Sofort nach Anschluß der Niere an die Perfusionsmaschine wurde eine Platin-Multiwire-Elektrode (von Kessler, 1968) auf die dafür vorpräparierte Nierenoberfläche aufgesetzt und somit der $PO_2$ während der Perfusionsdauer kontinuierlich gemessen. Sofort nach Beendigung der Perfusion wurde die $O_2$-Elektrode abgenommen, die Niere ebenfalls in Horizontalscheiben geschnitten und in 5% gepufferter Formalinlösung fixiert, wobei bis Fixationsbeginn 2 bis 3 Minuten vergingen.

Bei der Sauerstoffelektrode handelt es sich um eine Platinmehrdrahtelektrode nach Kessler (1968) für die Messung der lokalen Sauerstoffdrucke des Gewebes im Bereich von Organoberflächen. Die Elektrode ist derart konstruiert, daß sie für die Messung unter Zuhilfenahme eines kleinen Teflonhütchens, welches mit feuchtem Cellophan - oder Filterpapier - auf der Organoberfläche fixiert wird. Ihr Gewicht ist derart dimensioniert, daß bei ihrer Verwendung keine lokalen Druckschäden erzeugt werden.

Abb. 15
$PO_2$ - Mehrdrahtelektrode zur Messung der lokalen Sauerstoffdrucke im Gewebe




Mit dieser Elektrode können die Sauerstoffdrucke des Nierengewebes an 8-10 verschiedenen Stellen gleichzeitig und unabhängig voneinander registriert werden.

Drei Faktoren bestimmen die lokale Sauerstoffdruckverteilung des Gewebes:

1) Die Sauerstoffkapazität und die arterielle Sauerstoffaufsättigung des Blutes,

2) die konvektive Komponente der Mikrozirkulation in den einzelnen Kapillaren,

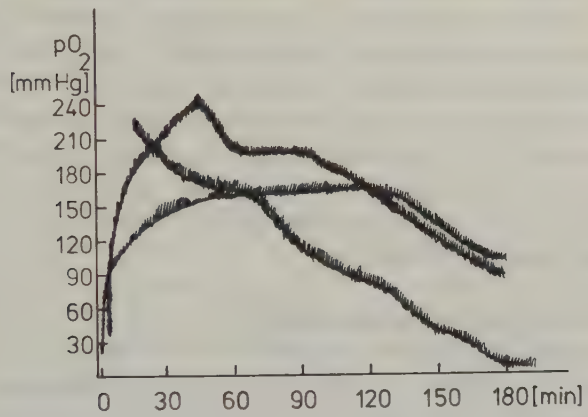
3) der zelluläre Sauerstoffverbrauch und der daraus resultierende Diffusionsstrom von Sauerstoffmolekülen von den Erythrozyten in den Kapillaren bis hin zu den Mitochondrien des Gewebes.

Normalerweise liegen die maximalen $PO_2$-Werte im Bereich von 15-30 mmHg. Abweichungen zeigte jedoch die Nierenrinde, die eine sehr hohe funktionelle Durchblutung aufweist. Die Methode ist zur Zeit eine der zuverlässigsten zur Erfassung von Störungen der Mikrozirkulation.
Die Zelle toleriert bei noch erhaltener Mikrozirkulation Sauerstoffmangel relativ gut, solange einerseits durch die anaerobe Glykolyse genügend Energie zur Verfügung steht, um die Protonen aus der Zelle zu eliminieren. Der bei kompletter Ischämie erzeugte Sauerstoffmangel führt durch Laktazidose zu einem raschen Verlust der energiereichen Phosphate und zu einer schnellen Zellschädigung (Kessler, Höper, Schäfer und Starlinger (1974)).

Die mit der Multiwire-Sauerstoffelektrode gemessenen lokalen Sauerstoffdrucke bei Gruppe II wurden auf Abb. Nr. 16 festgehalten.
Bei Niere 3 und 4 wurde die geeichte Sauerstoffelektrode sofort nach Perfusionsbeginn aufgesetzt, wobei die $PO_2$-Werte zwischen 20-40 mmHg lagen. Bei beiden Nieren stiegen die $PO_2$-Werte in den ersten 30 Minuten erheblich an, so daß sie nach 30 Minuten zwischen 150-210 mmHg lagen.
Bei Niere 1 wurde die Elektrode 20 Minuten nach Perfusionsbeginn aufgesetzt, so daß hier der Ausgangswert bei etwa 230 mmHg lag.
Im weiteren Verlauf nahmen die Werte wieder langsam ab, wobei Nieren 3 und 4 Endwerte von ca. 90 mmHg aufwiesen. Die Niere 1 fiel etwas stärker ab, der $PO_2$ lag bei 120 Minuten bei 86 mmHg und strebte nach 180 Minuten dem Nullwert zu.

Abb. 16

Sauerstoffdruckkurven für Nieren 1, 3 und 4 im Verlauf von 180 Minuten




Die in beschriebener Weise fixierten Nieren wurden von Herrn Professor Dr. Schubert, Pathologisches Institut der Universität Tübingen, histologisch untersucht.

Histologische Befundung von Schweinenieren

Schwein Nr. 1

1 N: Gehöriger Aufbau von Rinde und Mark, mittelweite Hauptstücklichtungen in der äußeren und mittleren Rinde, weite Hauptstücklichtungen in der inneren Rinde, die Sammelrohre sind im Rinden- und Markbereich insgesamt weit, ebenso die Mittelstücke. Nierenkörperchen unauffällig. Im Interstitium eine herdförmige Fibrose mit einzelnen kleinherdigen Rundzellenfiltraten, in diesen kleinen Narbenbezirken hier und dort einzelne sklerosierte Glomerula.

Gutachterliche Stellungnahme:
Leichte chronische interstitielle Nephritis mit geringgradigen herdförmigen Vernarbungszeichen im Rindenbereich.

1 P: Die Hauptstücke im gesamten Rindenbereich sind sehr weit, enthalten mehrfach homogene eiweißartige, zylinderartige Massen (Hb ?). Die Hauptstückepithelien sind geringgradig, herdförmig stärker hydropisch geschwollen. Im Bereich der Mittelstücke ebenfalls homogene hyaline Zylinder in größerer Zahl, im Rindenbereich weite, vorwiegend optisch leere Rindensammelrohre, unauffällige Markregionen. Daneben die oben beschriebene herdförmige interstitielle Nephritis, darüber hinaus ist das Interstitium ödematös leicht aufgelockert.

Gutachterliche Stellungnahme:
Es handelt sich um einen mäßiggradigen, nach histologischen Gesichtspunkten reversiblen hypoxämischen Nierenschaden vom Typ eines reversiblen akuten Nierenversagens.

Schwein Nr. 2

2 N: Im überwiegenden Teil des Präparates sind die Hauptstücklichtungen eng, die Epithelien unauffällig, weite Rindenmittelstücke und Rindensammelrohre, unauffällige Glomerula, regelrechtes Interstitium. In einem scharf begrenzten, infarktartigen Rindenabschnitt dagegen weitgestellte Hauptstücklichtungen. Keine entzündlichen Erscheinungen.

Gutachterliche Stellungnahme:
Der Befund entspricht völlig unauffälligem Nierengewebe mit Zeichen einer frischen hypoxämischen Schädigung eines infarktartigen Rindenbezirks.

2 P: Hauptstücklichtungen geringgradig erweitert, im Vordergrund steht eine ziemlich schwere hydropische Schwellung der Hauptstückepithelien, die Lichtungen enthalten mehrfach homogene eosinrote Zylinder (Hb ?), gleichartige Zylinder hier und dort auch in den Mittelstücken. Weite Rindensammelrohre. Unauffällige Nierenkörperchen.

Gutachterliche Stellungnahme:

Der Befund entspricht einem ziemlich schweren akuten hypoxämischen Nierenschaden vom Typ eines nach morphologischen Gesichtspunkten reversiblen akuten Nierenversagens.

Schwein Nr. 3

3 N: Nierengewebe mit einem normalen Bild. Enge bis mittelweite Hauptstücklichtungen und Mittelstücke, weite Rindensammelrohre, unauffällige Glomerula, regelrechtes Interstitium im Rindenbereich. Im Interstitium des Markes hier und dort ganz vereinzelte kleinzellige Infiltrate aus Lymphozyten und wenigen Granulozyten.

Gutachterliche Stellungnahme:
Es handelt sich um eine sehr geringfügige chronische interstitielle Nephritis im Markbereich vom Typ einer leichten chronischen Pyelonephritis, histologisch sonst unauffälligen Nierengewebes.

3 P: Herdförmig weitgestellte Hauptstücklichtungen, die mehrfach homogene Zylinder (Hb ?) enthalten und deren Epithelien mäßiggradig hydropisch geschwollen sind. Unauffällige Mittelstücke, weite Sammelrohre der Rindenregion mit regelrechten Epithelien. Interstitium im Rindenbereich unauffällig, im Markbereich hier und dort ganz vereinzelte kleinherdige Rundzellenfiltrate.

Gutachterliche Stellungnahme:

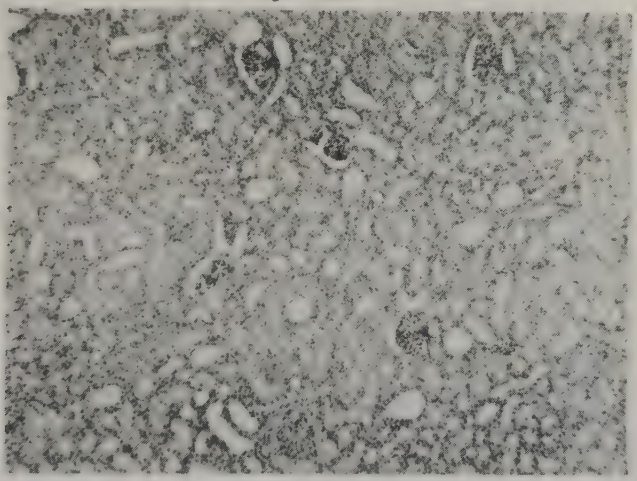
Es handelt sich um eine mäßiggradige hypoxische Schädigung des Nierenparenchyms vom Typ eines reversiblen akuten Nierenversagens und eine sehr geringfügige chronische interstitielle Nephritis im Markbereich (Pyelonephritis).

Schwein Nr. 4

4 N: Normales Nieren-Rindengewebe mit engen Hauptstücken, mittelweiten Mittelstücken und Sammelrohren sowie regelrechten Nierenkörperchen. Weitgehend unauffällige Markregion. Interstitium regelrecht.

Gutachterliche Stellungnahme:
Es handelt sich um unauffällige Nierengewebe.

Abb.17
Unauffälliges Nierengewebe



4 P: Mittel- bis weite Hauptstücke mit stärker hydropisch geschwollenen Epithelien, in den Lichtungen wiederholt hyaline Zylinder (Hb ?), auch in den Rinden-Mittelstücken und Sammelrohren hyaline eosinrote Zylinder. In der inneren Rindenzone eine hochgradige Erweiterung der Hauptstücke. Glomerula unauffällig, Interstitium regelrecht.

Gutachterliche Stellungnahme:

Es handelt sich um eine mäßiggradige hypoxämische Parenchymschädigung vom Typ eines reversiblen akuten Nierenversagens.

Schwein Nr. 5

5 N: Normales Nierenrindengewebe mit engen Hauptstücklichtungen, mittelweiten Mittelstücken und weiten Sammelrohren. Glomerula regelrecht, Interstitium unauffällig, unauffällige Markregion.

Gutachterliche Stellungnahme:
Es handelt sich um unauffälliges Nierengewebe.

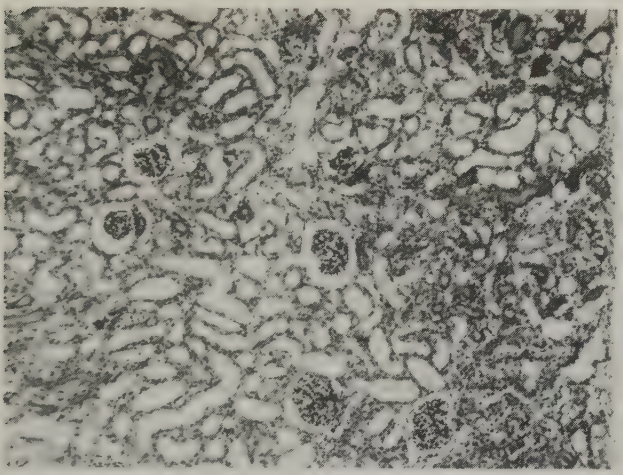
5 P: Deutliche Weitstellung der Hauptstücke, die wiederholt homogene eosinrote Zylinder (Hb ?) enthalten und deren Epithelien mehrfach deutlich hydropisch geschwollen sind. Weitgehend unauffällige Mittelstücke und weite Rindensammelrohre. Regelrechte Glomerula, unauffälliges Interstitium. Markregion regelrecht.

Gutachterliche Stellungnahme:

Es handelt sich um eine leichte bis mittelschwere hypoxämische Gewebsschädigung der Niere vom Typ eines reversiblen akuten Nierenversagens.

Abb. 18

Nierengewebe nach Perfusion mit Hb-Lösung



Zusammenfassende Beurteilung aller Fälle:

Insgesamt handelte es sich um deutliche Läsionen des Nierenrindengewebes.
Nach meinen Erfahrungen an tierexperimentellen Modellen und am menschlichen Nierenversagen würde ich jedoch alle diese Veränderungen aus morphologischer Sicht für fakultativ reversibel halten; derartige, insgesamt nicht sehr schwere Läsionen müssen nicht mit einer Oligurie einhergehen, es kommt gewissermaßen nur zu einer polyurischen Phase dieser Läsion vom Typ eines akuten Nierenversagens.
Differenziertere Funktionsanalysen würden sehr wahrscheinlich jedoch funktionelle Störungen aufdecken.

gez. Prof. Schubert

## V) DISKUSSION

Die Absicht der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung einer stromafreien Hämoglobinlösung unter normothermen Perfusionsbedingungen an isolierten Schweinenieren zu untersuchen. Ähnliche Untersuchungen einer stromafreien Hb-Lösung wurden bisher von Rabiner, O'Brien, Peskin und Freidmann (1970) sowie von Unseld (1973) an Hausschweinen durchgeführt. Die Versuche von Rabiner et al. hatten bei der Messung von Harnstoff, Kreatinin- und PAH-Clearance keinen Unterschied zwischen der Infusion von Hb-Lösung oder Blut ergeben. Auch die Ergebnisse von Unseld zeigten bei der Messung von Kreatinin- und PAH-Clearance keinen Anhalt für eine Einschränkung der Nierenfunktion. Er konnte berichten, daß die im Zeitraum von 6-22 Tagen nach Hb-Infusion durchgeführten histologischen Untersuchungen keine morphologischen Schäden aufzeigten. Andererseits wurde sowohl von Brandt, Frank und Lichtmann (1951), Miller und McDonald (1951) als auch von Burck und Augst (1971) gezeigt, daß ungereinigte, hämolytische Hämoglobinlösungen zu ganz bestimmten, morphologisch faßbaren Parenchymschäden führten. Es kommt somit wohl eine besondere Bedeutung der Hb-Ablagerung in den kleinen Nierengefäßen zu, da die daraus resultierende Ischämie für die auftretenden Effekte verantwortlich sein könnte.

Rabiner et al. (1970) konnten durch Versuche erhärten, daß die intravasale Blutgerinnung die wichtigste Ursache des Nierenversagens nach einer Hämolyse darstellt. Weiterhin konnten sie zeigen, daß hämolysiertes Blut die Gerinnung stimuliert, und daß die gerinnungsaktiven Substanzen im Erythrozytenstroma und nicht im Hämoglobin vorhanden sind. Sie benützten das Fehlen gerinnungsaktiver Substanzen als Test für die Reinheit der stromafreien Hb-Lösung.

Unseld (1973) kam auf Grund seiner Versuche an normalen Tieren sowie auch an Tieren im hämorrhagischen Schock zu dem Ergebnis, daß stromafreie Hb-Lösung als Plasmaexpander bzw. als Blutersatz durchaus erfolgversprechend sein könnte. Eine wesentliche Beeinträchtigung der Nierenfunktion, des Kreislaufs und der Sauerstoffaufnahme ist dadurch nicht zu erwarten.

Die vorliegende Untersuchung sollte deshalb Störungen anhand von laborchemischen und histologischen Ergebnissen feststellen.

Der Perfusionsdruck stellt im Experiment ein wertvolles Vitalitätskriterium dar (Grundmann, Raab, Mensel und Pichelmaier (1974)) dar. Normalerweise fällt der Druck in den ersten Stunden der Perfusion ab, erreicht dann ein konstantes Niveau und steigt nur an, wenn die Niere durch die Perfusion irreversibel geschädigt ist. Der initiale Druckabfall beruht auf der Lösung eines Vasospasmus, der nur gefunden wird, wenn das Organ nicht sachgemäß präpariert wurde. Aus diesem Grunde wird zur Nephrektomie die "No-Touch"-Methode empfohlen. Ursache des Druckanstieges sind Ödembildung und Endothelschädigungen sowie zu lange Perfusionszeiten. Ausgedehnte Perfusionszeiten führen zur Erhöhung des renalen Widerstandes, der sich bei volumenkonstanter Pumpleistung nur in einem Anstieg des Perfusionsdruckes äußern kann. Grundmann et al. (1974) konnten bei der Perfusion menschlicher Leichennieren mit Sofortfunktion nach Transplantation einen initialen Druckabfall und dann einen gleichbleibenden Perfusionsdruck nachweisen.

Da wir bei unseren Versuchen den Perfusionsdruck konstant hielten, mußten wir bei einer Erhöhung des Perfusionsdruckes die Perfusionsgeschwindigkeit leicht drosseln. Bei der Versuchsgruppe I mußte deshalb bei allen Nieren nach ca. 60 Minuten die Perfusionsgeschwindigkeit leicht verringert werden, um den Perfusionsdruck konstant halten zu können. Es ergaben sich dann relativ konstante Perfusionsflowraten zwischen 60 und 67 ml/min. bzw. 0,96 - 1,02 ml/g/min. Eine Ausnahme machte die Niere Nr. 7, welche einen ligierten venösen Abgang hatte. Hier war der Perfusionsflow nach 60 Minuten auf 40 ml/min. abgefallen.

Ein Problem ist es nach wie vor, das günstigste Verhältnis zwischen Druck und Durchströmungsrate zu finden. Die verschiedenen Arbeitsgruppen sind nicht einig darüber, wie hoch der Perfusionsdruck und die Durchströmungsrate letztlich sein sollen. Will man den Erhaltungszustand des Organs schon zu Perfusionsbeginn erfassen, muß zusätzlich die Durchströmungsrate berücksichtigt werden.

Schon 1968 wiesen Belzer et al. darauf hin, daß die Freisetzung der LDH die ischämische Nierenschädigung charakterisiert. Grundmann und Mitarbeiter zeigten 1973 und 1974, daß weniger die Absolutmenge an LDH als vielmehr der Verlauf der Enzymausschüttung als Vitalitätskriterium zu verwenden sei. Außerdem sei die LDH-Konzentration von der Osmolarität des Perfusats, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig - das pH-Optimum der LDH liegt bei 7,5 -.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die LDH-Konzentration im Perfusat und im Urin der Gruppe I fortlaufend kontrolliert. Auffällig war die nach 1 Minute gemessene relativ hohe Urin-LDH-Konzentration, die mit Ausnahme der 7. Niere nach 3 Minuten stark

abfiel. Die hohen LDH-Konzentrationen lassen sich wohl am ehesten als Schädigung der Tubuluszellen durch die Sacksche Lösung erklären. Drei Minuten nach Ausschwemmung der Sackschen Lösung lagen die LDH-Werte wieder im Normalbereich.

Auf der gleichen Ursache beruht der Anstieg der LDH-Konzentrationen der Gruppe I im Perfusat während der ersten 30 Minuten und die Abnahme der LDH-Konzentrationen in den darauffolgenden 30 Minuten. Einem späteren Anstieg von LDH liegt eine Akkumulation der im Perfusat vorhandenen LDH-Konzentrationen sowie eine langsame Schädigung der Nieren zugrunde.

Parallel zu den anfänglich stark erhöhten LDH-Konzentrationen fielen sehr hohe Kaliumkonzentrationen im Urin und im Perfusat auf. Wir erklärten uns die hohen Kaliumkonzentrationen durch Verwendung der kaliumreichen Sackschen Lösung. Im Urin fielen die Kaliumwerte nach 3 Minuten durch Ausschwemmung der Sackschen Lösung durch gesteigerte tubuläre Sekretion ab, während sie im Perfusat,mit Ausnahme der 5. und 7. Niere, gleichblieben. Der Anstieg der Kaliumkonzentrationen im Perfusat der 5. und 7. Niere wiesen auf eine Schädigung der betreffenden Nieren mit anschließenden Elektrolytverlusten hin.

Besonders deutlich war auch der starke Abfall des anorganischen Phosphats im Urin innerhalb der ersten 60 Minuten. Wahrscheinlich verursachte die Sacksche Lösung die deutliche Erhöhung und den nachfolgenden Abfall des anorganischen Phosphats im Urin, welches aus dem intrazellulären Raum der Tubuluszellen durch hydrolysierende Phosphate freigesetzt wurde.

Petersen, Hrynczuk, Scheibel und Søvensen (1972) hatten als weiteren Parameter vor allem den Eiweißgehalt des Urins für eine Funktionstestung angesehen. Bei ihren Versuchen betrug der maximale Urin-Eiweißgehalt ungefähr 1/10 der Eiweißkonzentration des Perfusats. Sie führten dies auf die intakte Funktion der glomerulären Membranen zurück. Bei früheren Versuchen war der Eiweißgehalt bei schlecht perfundierten Nieren im Urin wesentlich höher als im Perfusat. Bei unseren Untersuchungen war eine minimale Erhöhung des Gesamteiweißes im Urin zu erkennen, wobei die Perfusatkonzentrationen doppelt so hoch waren wie die im Urin. Diese Befunde sprachen für eine geringfügige Schädigung der glomerulären Membran.

Daß es sich bei der Natriumresorption um einen energieverbrauchenden Prozeß handelt, geht aus der linearen Korrelation zwischen Na-Resorption und renalem $O_2$-Verbrauch hervor. Während der Perfusion fand ein Sauerstoffverbrauch statt. Die arterielle $O_2$-Spannung nahm anfänglich ab und blieb dann relativ konstant bei gleichzeitig leicht ansteigender Na-Konzentration im Urin.

Die Erhöhung des Bilirubinspiegels um Urin sprach für eine Umwandlung von Hämoglobin in Bilirubin im retikuloendothelialen System der Niere.

Bei einer Oxygenierung des Perfusats mit 9.5% $O_2$ und 5% $CO_2$ ergab sich bei den Nieren 3, 4, 5 und 6 eine ansteigende und bei den Nieren 1 und 2 eine starke Zunahme der Lactatkonzentrationen, wahrscheinlich durch eine anaerobe Glykolyse ausgelöst (Abbot und Sell (1968)). Im Gegensatz dazu war jedoch ein leichter Anstieg der pH-Werte festzustellen, der unter Umständen durch die Abpufferung der Perfusionslösung mit Na-Bicarbonat hervorgerufen wurde.

Einen weiteren Parameter zur Vitalitätsmessung der Niere stellte die Messung der $O_2$-Spannung des Nierenrindengewebes mittels der Multiwire-Sauerstoffelektrode dar. Die bei der Versuchsgruppe II gemessenen Sauerstoffspannungen zeigten ihre maximalen Werte nach 60 Minuten.

Die histologische Beurteilung der Nieren der Gruppe II, die unter denselben konstanten Bedingungen wie die der Gruppe I perfundiert wurden, ergab insgesamt eine deutliche hyposmotische Läsion des Nierengewebes aufgrund einer leichten bis mittelschweren hypoxämischen Gewebeschädigung vom Typ eines reversiblen akuten Nierenversagens. Es wäre zu überlegen, ob die hypoxämische Gewebeschädigung aufgrund einer völligen Substitution der roten Zellen durch freies Hb eingetreten ist (Petersen et al. (1973)). Druckerhöhung und Abnahme der Durchblutung scheinen Eigenschaften des freien Hb zu sein, da dieses Verhalten auch nach Infusionen von hämolysiertem Blut beobachtet wurde (Abbott und Sell (1968)). Möglicherweise besteht eine Regelbeziehung zwischen der Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes und dem freien Hb, die einen entsprechenden Anstieg des Filtrationsdrucks erforderlich macht. Das gesamte Hb der Erythrozyten würde in frei gelöstem Zustand eine 3-fache Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes erzeugen (Unseld (1973)). Jedoch scheint ein relativ kleiner Teil davon die Plasma-$O_2$-Konzentration spürbar zu erhöhen und damit die $O_2$-Versorgung zu verbessern, wie die Versuche von Unseld zeigten.

Die hier diskutierten Versuchsparameter zeigen deutlich die Fähigkeit der stromafreien Hb-Lösung, Schweinenieren in vitro über einen beachtlichen Zeitraum funktionsfähig zu erhalten. Funktionseinschränkungen, die im Laufe der Perfusion auftraten - kontrolliert durch laborchemische und histologische Untersuchungen - waren während der gesamten Versuchsdauer als reversibel anzusehen.

## VI) ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion und der Sauerstoffverbrauch von warmperfundierten Schweinenieren mittels einer stromafreien Hämoglobinlösung untersucht werden. Hierfür wurden 13 Nieren von Hausschweinen mit einer Perfusionslösung - bestehend aus einer stromafreien Hb-Lösung und einer im Handel erhältlichen 5%igen Human-Albumin-Lösung im Verhältnis 1:2 - perfundiert. Perfundiert wurde mittels einer Gambro-Perfusionsmaschine mit einer nicht pulsatilen Rollerpumpe und einem Membran-Oxygenator mit Füllvolumen. Die Temperatur betrug konstant 37° C, der Perfusionsdruck lag bei 110 mm Hg. Die Perfusion dauerte maximal 3 Stunden. Während der Perfusion wurden zu bestimmten Zeiten die Urinmenge und die Perfusionsgeschwindigkeit gemessen. In den selben Intervallen wurden aus den arteriellen und venösen Perfusionsproben folgende Laborparameter bestimmt: Lactat, Pyruvat, LdH, ATP, Gesamteiweiß, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, anorganischer Phosphor und sämtliche Elektrolyte. Außerdem wurden pH-Wert, $pCO_2$-Wert und $PC_2$-Wert bestimmt. Aus den regelmäßig abgenommenen Urinproben wurden in entsprechender Weise ATP, LdH, anorganischer Phosphor, Harnsäure, Gesamteiweiß und Elektrolyte ermittelt. Die lokalen Sauerstoffdrucke der Nierenrinde wurden mittels einer Platin-Multiwire-Elektrode (nach Kessler) kontinuierlich gemessen.

Die von Herrn Professor Schubert in der Pathologie durchgeführten histologischen Untersuchungen an den jeweiligen perfundierten und nicht-perfundierten kontralateralen Nieren ergaben folgende Befunde:

In allen perfundierten Nieren lagen fakultativ reversible Läsionen des Nierenrindengewebes vor. Die histologischen und laborchemischen Ergebnisse der durchgeführten Versuche in dieser Arbeit zeigen, daß die stromafreie Hämoglobinlösung durchaus als Sauerstoffträger für einen begrenzten Zeitraum zur Organperfusion geeignet ist.

LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT, W.M. and K.W. SELL:
Functional in vitro analysis as a key to organ storage.
In: Organ Perfusion and Preservation (J.C.Norman, Ed.), Appleton Century Crofts, New York, p.487 (1968)

ABOUNA, G.M.:
Pig liver perfusion with human blood. The effect of preparing and flushing the liver with various balanced solutions on its subsequent viability and function.
Br.J.Surg. 55, 761-768 (1968)

ACKERMANN, J.R. and C.N. BARNARD:
Successful storage of kidneys.
Brit.J.Surg. 53, 525-532 (1968)

ACKERMANN, J.R. and C.N. BARNARD:
The diagnostic importance of abnormal urinary sediment stains in canine renal homografts.
S.African Med.J. 39, 571-574 (1965)

AMBERSON, W.R., J.J. JENNINGS and C.M. RHODE:
Clinical experience with hemoglobin-saline solutions.
J.Appl.Physiol. 1, 469-489 (1949)

ANDERSON, M.N., C.V. MOURITZEN and E.R. GABRIELLES:
Hemoglobin-Clearance after Hemolysis.
Ann. Surg. 164, 905-912 (1966)

BAINBRIDGE, F.A. and C.L. EVANS:
The heart, lung, kidney preparation.
J.Physiol. (London) 48, 278-286 (1914)

BEISANG, A.A., E.F. GRAHAM, R.C. LILLEHEI, R.H.DIETZMAN and J.E. CARTER:
Enzyme levels in the effluent perfusates from frozen canine kidneys.
Transplant.Proc. 1, 862-881 (1969)

BELZER, F.O., B.S. ASHBY and J.E. DUNPHY:
24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys.
Lancet II, p.536-538 (1967)

BELZER, F.O., B.S. ASHBY, P.F. GULYASSY and M.POWELL:
Successful seventeen hour preservation and transplantation of human cadaver kidney.
New Engl.J.Med. 278, 608-610 (1968)

BELZER, F.O., B.S. ASHBY, J.S. HUANG and J.E. DUNPHY:
Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion.
Ann.Surg. 168, 382-391 (1968)

BELZER, F.O., B.S. ASHBY, R.E. MARY and J.E. DUNPHY:
Isolated perfusion of whole organs.
In: "Organ Perfusion and Preservation" (J.C.Norman, Ed.), Appleton, New York, 3-12 (1968)

BENESCH, R. and R.E. BENESCH:
Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin.
Nature 221, 618-622 (1969)

BICKFORD, R.G. and F.R. WINTON:
The influence of temperature on the isolated kidney of the dog.
J. Physiol. (London) 89, 198-219 (1937)

BOGATZKI, G.: Archiv für das Hüttenwesen 12, 195 (1938)

BONHARD, K.: Preparation and function of an infusable hemoglobin solution.
In: Synthesis, Structure and Function of hemoglobin, Intern. Symp., Bad Nauheim,(1971)

BONHARD, K.: Chemische Charakterisierung eines Plasmaersatz-Präparates.
Arzneimittelforsch. 21, 1667-1671 (1971)

BRANDT, J.L., N.R. FRANK and H.C. LICHTMANN:
The effects of hemoglobin solution on renal functions in man.
Blood 6, 1152-1158 (1951)

BROWN, J.W., R. BALBROOK and F.C. GREENWOOD:
An evaluation of a chemical method for the estimation of oestriol, oestrone and oestradiol-17 ß in humane urine.
J.Endocrinol. 16, 41-48 (1957)

BUCHBORN, E.: Akutes Nierenversagen.
In: Klinische Pathophysiologie (W.Siegenthaler, Ed.), Thieme Verlag, Stuttgart, 837-840 (1973)

BÜCHER, Th. : Biochim.biophys. Acta (Amst.) 1, 292 (1947)

BURCK, H.-CH. und J. AUGST:
Tierexperimenteller Beitrag zum Nierenversagen durch Hämoglobin.
In: Aktuelle Probleme der Dialyseverfahren und der chronischen Niereninsuffizienz (P.v.Dittrich,Hrsg.), IV. Innsbrucker Symp. (1971)

CARREL, A. and C.A. LINDBERGH:
"The Culture of Organs".
Harper (Hoeper), New York (1938)

CHASSON, A., H. GRADY and M.A. STANLEY:
Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis.
Techn.Bull.Regist.Med.Techn. 30, 207-212 (1960)
Am.J.Clin.Path. 35, 83 (1961)

CLAES, G., M. AARELL and U. BRUNIUS:
Njurförvaring med kintinuierlig perfusion.
Nordisk Medicin 84, 923 (1970)

CLAES, G., J. BLOHME and L.E. GELIN:
Clinical kidney preservation with and without continuous perfusion.
Proc. E.D.T.A., p. 307 (1971)

CLAES, G., J. BLOHME, L.E. GELIN, A. GUSTAVSSON, CH. HENDRIKSSON and B. STORM:
Clinical experience of long-time preservation of cadaver kidneys.
National Medical Conference, 25 Nov 1971, Stockholm (1971)

COLLINS, G.M., M. BRACO-SHUGARMAN and P.J. TERASAKI:
Kidney preservation for transportation.
Lancet II, 1219 (1969)

CZOK, R. und W. LAMPRECHT:
Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat.
In: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim, Bd.II, 2.Aufl., 1407 (1970)

EDELMANN, J.S. and J. LIEBMANN:
Anatomy of Body Water and Electrolytes.
Am.J.M. 27, 256 (1957)

FLORES, J., D.R. DIBONA, C.H. BECK and A. LEAF:
The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute.
J.Clin.Invest. 51, 118 (1972)

FUHRMANN, G.J. and F.A. FUHRMANN:
Effects of temperature on metabolism of glucose in vitro.
Am.J.Physiol. 207, 849-852 (1964)

GEDIGK, P. und V. TOTOVIC:
Zell- und Gewebsschäden.
In: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie (H. Hamperl), 47-48 (1974)

GELIN, L.E., G. CLAES, A. GUSTAVSSON et al.:
Totel bloodlessness for extracorporeal organ repair.
Rev.Surg. 28, 305-316 (1971)

GRUNDMANN, R. und H. PICHLMAIER:
Nierenkonservierung durch maschinelle Dauerperfusion.
Chirg. 44, 413-418 (1973)

GRUNDMANN, R. and H. PICHLMAIER:
LDH-Release in various experimental conditions as criterion for biability of the hypothermic perfused kidney.
Res.exp.Med. 159, 198-305 (1973)

GRUNDMANN, R., M. RAAB, E. MENSEL und H. PICHELMAIER:
Erste Erfahrungen mit der nicht pulsierenden Perfusion.
Dtsch.Med.Wschr. 99, 2325-2331 (1974)

HAMILTON, P.B., A. HILLER and D.D. Van SLYKE:
Renal Effects of Hemoglobin Infusions in Dogs in Hemorrhagic Shock.
J.Expl.Med. 86, 477-487 (1947)

HARTLEY, L.C., G.M. COLLINS and G.J. CLUNIE:
Kidney Preservation for Transplantation.
6. A new perfusate applied to human cadaveric kidneys.
Med.J.Aust. 1, 1173-1176 (1971)

HENDERSON,A.H., R.J. CRAIG, R. GORLIN and E.H.SONENBLICK:
Lactate and Pyruvate Kinetics in Isolated Perfused Rat Hearts.
Amer.J.Physiol. 217, 1752-1756 (1969)

HENDRY, W.F., N.W. STRUTHERS, W.P. DUGUID and W.J.J. HOPKINSON:
Twenty-four hour Storage of Kidneys.
Lancet I, 1221-1225 (1968)

HERRMANN, T.J., J.G. TURCOTTE, C.H. SLOAN and C.W.O'DELL:
Low Flow Perfusion, Dilute Serum and Hyperbaric Oxygen in the Preservation of Canine Kidneys.
Invest.Urol. 7, 493-509 (1970)

HIERHOLZER, E., V. ZÜHLKE, M. HÖLSCHER und W. DIETZ:
Veränderungen der energiereichen Phosphate des Gewebes während verschiedener Zeitpunkte und Methoden der experimentellen und klinischen Nierenkonservierung.
Langenbeck's Arch.Chir.Suppl.Chir.Forum, 147-151, (1973)

HOHERST, H.J. :
Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD.
In: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim, Bd.II, 2.Aufl., 1425 (1970)

HORPÁCSY, G., A. NÉMETH, K. TÁRNOKY, T. BARANKAY und G. PETRI:
Enzymuntersuchungen während der hypothermen Perfusion der isolierten Hundenieren.
Z.ges.exp.Med. 155, 273-280 (1971)

HUSDAN, H. and A. RAPOPORT:
Estimation of Creatinine by the Jaffe Reaction.
A comparison of three methods.
Clin.Chem. 14, 222-238 (1968).

JOHNSON, R.W.J.: Ischaemic Injury and Kidney Preservation.
The Effect of Ischaemic Injury on Kidneys Preserved for 24 hours before Transplantation.
Br.J.Surg. 59, 765-770 (1972)

KELLER, R., J. SWINNEY, R.M. TAYLOR and P.R. ULDALL:
The Problem of Renal Preservation.
Brit. J. Urol. 38, 653-656 (1966)

KESSLER, M., J. HÖPER, D. SCHÄFER und H. STARLINGER:
Sauerstofftransport im Gewebe.
Klinische Anästh. u. Intensivtherapie 5, 36-52 (Springer) (1974)

KISER, J.C., R.L. TELANDER, T.A. PETERSON, J.J. COE and C.R. HITCHCOCK:
Canine Renal Autografts. Studies on reversible histopathologic changes following prolonged extracorporeal refrigeration.
Arch.Surg. 83, 502-511 (1961)

KOHN, M. and H. ROSS:
Lactate Dehydrogenase Output of the Excised Kidney as an Index of Acute Ischaemic Renal Damage.
Transplantation 11,(Baltimore), 461-464 (1971)

KOVACS, S., L.PERSKY, R.STUEBER and S.LILETSKY:
The Protective Value of Hypothermia in Renal Anoxia: Evaluation by Selective Cooling of the Kidney.
Anesthesia Analgesia 48, 157-161 (1959)

LANGENDORFF, O.: Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.
Arch.Ges.Physiol. 61, 291-332 (1895)

LANGENDORFF, O.: Über den Einfluß von Wärme und Kälte am Herz der warmblutigen Tiere.
Arch.Ges.Physiol. 66, 439-464 (1897)

LATHEM, W.: The Renal Excretion of Hemoglobin. Regulatory Mechanisms and the Differential Excretion of Free and Bound Hemoglobin.
J.Clin.Invest. 38, 652-658 (1959)

LEFEBRE, L.: Reins au cou préalablement perfusés et conservés à basse température.
Compt.Rend.Soc.Biol. 145, 1895-1899 (1951)

LEVY, M.N.: Oxygen Consumption and Blood Flow in the Hypothermic Perfused Kidney.
Am.J. Physiol. 197, 1111-1114 (1959)

LØKKEGARD, H., A. FERNANDES and N. GYRD-HANSEN: Kidney Preservation with Hypothermia and Hyperbaric Oxygen. II. Renal Clearances in Pigs with Autotransiated 24-hour Preserved Kidneys.
Acta Med.Scand. 187, 195-202 (1970)

MARSH, W.H., B. FINGERHUT and H. MILLER: Automated and Manual Direct Methods for the Determination of Blood Urea.
Clin.Chem. 11, 624-627 (1965)

MILLER, J.H. and R.K. McDONALD: The Effects of Hemoglobin on Renal Function in the Human.
J.Clin.Invest. 30, 1033-1040 (1951)

MURRAY, R.K., G.E. CONNELL and J.H. PERT:
The Role of Haptoglobin in the Clearance and Distribution of Extra-corpuscular Hemoglobin.
Blood 17, 45-53 (1961)

MUSSER, A.W. and C. ORTIGOZA:
Automated Determination of the Uric Acid by the Hydroxylamine Method.
Techn.Bull.Regist. Med.Techns. 36, 21-25 (1966)

NEWBURG, L.H. and A. LEAF:
Significance of Body Fluids in Clinical Medicine.
Springfield, Ill. (1955)

O'SHAUGHNESSY, L., H.E. MANSELL and D. SLOME:
Hemoglobin Solution as a Blood Substitute.
Lancet II, 1068-1069 (1939)

OSTROW, J., J.H. JAHNDL and R. SCHMID:
The Formation of Bilirubin from Hemoglobin in vivo.
J.Clin.Invest. 41, 1628-1637 (1962)

PESKIN, G.W., K. O'BRIEN and S.F. RABINER:
Stroma-free Hemoglobin Solution. The "ideal" blood substitute ?
Surgery 66, 185-193 (1969)

PETERSON, F.B., J.R. HRYNCZUK, J.H. SCHEIBEL and B.L. SØVENSEN:
Urine Production and Metabolism of Glucose and Lactic Acid in the Kidney during 36 hours of Cooling and Perfusion with Diluted Plasma.
Scand.J. Urol.Nephrol. 7, 68-73 (1973)

RABINER, S.F., J.R. HELBERT, H. LOPAS and L. FRIEDMANN:
Evaluation of a Stroma-free Hemoglobin Solution for Use as a Plasma Expander.
J.Exptl. Med. 126, 1127-1142 (1967)

RABINER, S.F., K. O'BRIEN, G.W. PESKIN and L.FRIEDMANN:
Further studies with Stroma-Free Hemoglobin Solution.
Ann.Surg. 171, 615-622 (1970)

RAHMER, H., J. DURST und G.E. SCHUBERT:
Correlation between local oxygen tension in muscle tissue and survival time in tourniquet shock.
Circ. Shock 4 (1), 35-40 (1977)

RICHARDS, A.N. and O.H. PLANT:
Urine Formations in the Perfused Kidney. The Influence of alterations in Renal Blood Pressure on the Amount and Compositions of Urine.
Am.J.Physiol. 59, 144-183 (1922)

SHATKIN, S., R. ANTHONE, S. ANTHONE and A.E.MAC NEILL:
Organ Perfusion: Maintenance of function of canine kidneys in vitro by a new perfusion technique.
Plastic Reconst.Surg. 29, 167-175 (1962)

SOBRINHOE-SIMOES, M.: A sensitive method for the measurement of serum uric acid using hydroxylamine.
J.Lab.Clin.Med. 65, 665-668 (1965)

SWANK, R.L., J.H. FELLMAN and W.W. HISSEN:
Aggregation of blood cells by 5-hydroxy-tryptamine (Serotonin).
Circ.Res. 13, 392-400 (1963)

TANAKA, N., L.E. STEVENS and P.J. TERASAKI:
Storage and transport of 83 human kidneys by simple hypothermia.
Transplantation 12, 348-352 (1971)

TELANDER, R.L.: Prolonged normothermic perfusion of the isolated primate and sheep kidney.
Surg.Gynecol.Obstet. 118, 347-353 (1964)

UNSELD, H.M.: Der Einfluß einer stromafreien Hämoglobinlösung auf den Kreislauf, die Sauerstoffaufnahme und die Nierenfunktion von Zwergschweinen.
Habilitationsschrift, Universität Tübingen (1973)

VAN KAMPEN, E.J. and W.G. ZIJLSTRA:
Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method.
Clin.chim.Acta 6, 538-544 (1961)

VAN SLYKE and HILLER : J.Biol.Chem. 78, 807 (1928)

VAN ZYLE, J.J.W., J.A. VAN ZYLE, J.H. GROENEWALD, R. SCHOONESS, A. LOCHNER and G.P. MURPHY:
Metabolic alteration in baboon kidneys during isolated bloodless perfusion and after prolonged storage with oxygen or helium.
S.African Med. J. Suppl. 17, 58-68 (1968)

VERNEY, E.B. and E.H. STARLING:
On secretion by the isolated kidney.
J.Physiol. (London) 56, 353-358 (1922)

VOGT, M.T. and E. FARBER:
On the molecular pathology of ischemic cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations.
Amer.J.Path. 53, 1-26 (1968)

WEICHSELBAUM, T.E.: Am.J.Clin.Path. 16, 40 (1946)

WROBLEWSKI, F. and J.S. LADUE: Proc.Soc.exp.med.90, 210 (1955)

ZILVERSMIT, D.B. et al.: J.Bab.clin.Med. 35, 155 (1950)

Gabriele Schwenk
Robert-Leicht-Str. 49 B
7000 Stuttgart 80

## Tabellarischer Lebenslauf und Tätigkeitsnachweis

| | |
|---|---|
| 15.10. 1949 | geboren in Stuttgart |
| 1956-1960 | Besuch der Grundschule |
| 1960-1968 | Besuch des Mädchengymnasiums St. Agnes in Stuttgart mit Abschluß der Reifeprüfung 20.7.70 |
| Sommer 1968 | Krankenpflegedienst im Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart (2 Monate) |
| WS 1968 bis SS 1969 | Studium der Chemie und Biologie an der Universität Tübingen |
| August 1969 bis März 1970 | Medizinisch-Technische Assistentin im Amerikanischen Krankenhaus, Stuttgart |
| WS 1970 | Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen |
| 16.12.1976 | Staatsexamen |
| 1977 | Medizinalassistentenzeit:<br>4 Monate Chirurgie am Zentrum für Chirurgie der Universität Ulm,<br>4 Monate Innere Medizin am Robert-Bosch-Krankenhaus<br>4 Monate Gynäkologie und Geburtshilfe, ebenfalls am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart |
| 1.4.1978 | Approbation als Arzt |
| 1.5.1978 | Assistenzärztin an der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Krankenhauses Ludwigsburg |